

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

studijní program: Biochemie



Mgr. Petra Vlčková (rozená Bašová)

**Studium mechanismů agresivity akutní myeloidní leukemie v myším
modelu nesoucím mutace genů *Spi1* (*PU.1*) a *Trp53*.**

**Delineating aggressiveness of acute myeloid leukemia in a mouse model
carrying mutations of *Spi1* (*PU.1*) and *Trp53*.**

Disertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Tomáš Stopka, PhD

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem disertační práci „Studium mechanismu agresivity akutní myeloidní leukemie v myším modelu nesoucím mutace genů PU.1 a p53“ zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Současně prohlašuji, že tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 18.12.2013

Podpis

Tato práce je věnovaná mým rodičům

Poděkování:

Ráda bych zde poděkovala všem, kteří mě jakkoli motivovali a podporovali ve výzkumu týkajícího se tématu mé disertační práce a také těm, kteří mi v rámci řešení mých vědecko-výzkumných či studijních aktivit byli jakkoli nápomocni.

Zejména bych na tomto místě ráda poděkovala mému školiteli, doc MUDr. Tomášovi Stopkovi PhD za příkladné odborné vedení a to především za vědecké podněty, diskuse a názory, kterých se mi od něj po celou dobu doktorského studia dostávalo.

Dále bych chtěla poděkovat mým kolegům z laboratoře, kteří mi pomáhali svými připomínkami, radami i náměty při obtížích nebo otázkách, na které jsem při práci narazila. Jmenovitě bych ráda poděkovala: Dr. Vítovi Pospíšilovi, Bc. Filipu Savvulidimu, Dr. Pavlovi Burdovi, Dr. Karině Vargové, Mgr. Martině Dluhošové, Dr. Nikolovi Čuříkovi, Mgr. Tomášovi Zikmundovi, Dr. Erice Kužmové, Mgr. Vojtovi Kulvaitovi, Dr. Jarmile Vargové a Mgr. Haně Huškové.

Děkuji rovněž všem členům Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK, obzvláště bývalému i současnému přednostovi Prof. MUDr. Emanuelovi Nečasovi, DrSc. a Doc. MUDr. Martinu Vokurkovi, CSc. za přátelské pracovní prostředí.

Ráda bych poděkovala Dr. Liborovi Staňkovi a Dr. Ulrichovi Steidlovi za cennou odbornou spolupráci při výzkumu, který je předmětem této práce.

V neposlední řadě patří mé poděkování též mé rodině za nezměrnou trpělivost a podporu, které si velice vážím.

Disertační práce byla vytvořena za podpory následujících projektů:

GACR P305/12/1033 z Grantové agentury České republiky.

PRVOUK-P24/LF1/3, UNCE204021 a SVV-2013-266509 od Univerzity Karlovy v Praze.

Práce je součástí i projektu BIOCEV – Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of Sciences and Charles University (CZ.1.05/1.1.00/02.0109), from the European Regional Development Fund.

Obsah

Prohlášení	2
Poděkování	3
Obsah	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:	8
ABSTRAKT	11
ABSTRACT	12
VŠEOBECNÝ ÚVOD	13
Krvetvorba	13
Akutní myeloidní leukémie (AML)	15
Epidemiologie a definice AML	15
Diagnóza, klasifikace a léčba AML	16
Mechanismus a geny odpovědné za vznik AML	20
Antionkogeny v AML	21
Transkripční faktor PU.1	21
"Strážce genomu" p53	26
Onkogeny v AML	29
mikroRNA-155	30
E-box protein Myb	36
HYPOTÉZA A SPECIFICKÉ CÍLE	39
MATERIÁL	41
Přístroje a pomůcky	41
Speciální počítačové programy	42
Biologický materiál	42
Myší modely	42
Primární vzorky pacientů s AML/MDS a zdravých kontrol	43
Buněčné linie	45
Kvasinky	45
Primery a TaqMan® sondy	45
Protilátky	52
Enzymy	52
Chemikálie	53
Roztoky a pufrы	55

Média, buněčná kultivace	59
Komerčně dodávané sady	60
METODY	61
Genotypizace	61
Izolace DNA.....	61
PCR	61
Detekce produktů PCR pomocí agarosové elektroforesy	62
Separace mononukleárních buněk	62
Periferní krev	62
Kostní dřev	63
Slezina	63
PBMC – mononukleární buňky z periferní krve	63
Barvení krevních nátěrů.....	63
Histologie.....	64
Imunohistochemie (IHC)	64
Průtoková cytometrie.....	65
Analýza exprese povrchových antigenů.....	65
Analýza proteinové úrovně PU.1	66
Magnetická separace.....	67
Izolace RNA a přepis do cDNA	68
Izolace RNA	68
Přepis mRNA do cDNA	68
Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) a vyhodnocení mRNA exprese.....	69
Chromatinová imunoprecipitace.....	70
Transientní transfekce.....	72
Transfekce c-Kit ⁺ buněk pomocí lipofilního činidla DMRIE-c	72
Transfekce NB4 buněk pomocí nukleofektoru AMAXA.....	73
Kultivační detekce kolonie tvořících buněk (Mouse Colony-Forming Cell Assays) a její využití pro transientní inhibici exprese.....	74
VÝSLEDKY	75
Myši s dvojitou mutací PU.1/p53 vyvíjejí agresivní AML.....	75
Snížená hladina exprese PU.1 a deregulace miR-155 u myši PU.1 ^{ure/ure} a PU.1 ^{ure/ure} p53 ^{-/-} s AML	89
Onkogeny Myb a Myc jsou deregulovány v leukemických buňkách myši PU.1 ^{ure/ure} p53 ^{-/-}	95

Onkogeny Myb a Myc jsou deregulovány v leukemických buňkách myší PU.1 ^{ure/ure} p53 ^{-/-}	96
Funkční testy odhalující význam dráhy: p53/Myb/miR-155/PU.1 v myší AML.	97
Funkční testy odhalující význam dráhy: p53/Myb/miR-155/PU.1 v myší AML.	98
Funkční testy odhalující význam dráhy: p53/Myb/miR-155/PU.1 v myší AML.	99
Dysregulace dráhy p53/Myb/miR-155/PU.1 je pozorovatelná i u lidské AML	109
DISKUZE	117
SHRNUTÍ ZÁVĚRŮ DISERTAČNÍ PRÁCE	125
SPOLUAUTOŘI	126
ODKAZY NA POUŽITOU LITERATURU	127
SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA:	142
PŘÍLOHY	143

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

AML	Akutní M yeloidní L eukémie
APL	Akutní P romyelocytární L eukémie
APC	Allofykocyanin (A llo p hyco c yanin)
BFU	B urst F orming U nit
BIC	B cell I ntegration C luster
bp	Párů bazí (b ase p air)
BSA	Hovězí sérový albumin (B ovine S erum A lbumine)
cDNA	Komplementární (complementary) DNA
CFU	C olony F orming U nit
DGCR8	D i G eorge syndrome C ritical R egion gene 8
CLL	C hronická L ymfatická L eukemie
CLP	Společná lymfoidní progenitorová buňka (C ommon L ymphoid P rogenitor)
CMP	Společná myeloidní progenitorová buňka (C ommon M yeloid P rogenitor)
DMSO	D imethylsulfoxid
DNA	D eoxyribonukleová kyselina (a cid)
dNTPs	D eoxynukleotid trifosfat
DOB	Datum narození (D ate O f B irth)
EDTA	Kys. E tyl e ndiamintetraoctová (a cid)
EtBr	E thidium B romid
FAB	F rancouzsko- A mericko- B ritská klasifikace AML
FACS	Fluorescenčně-aktivované třídění buněk (F luorescence A ctivated C ell S orting)
FADD	F as-associated protein with d eath d omain
FBS	Fetální hovězí sérum (F etal B ovine S erum)
FITC	Fluorescein isothiokyanát (F luorescein I sothiocyanate)
FOXP3	F orkhead box P3
GAPDH	G lyceraldehyd 3- f osfat d ehydrogenasa
GFP	Zelený fluorescenční protein (G reen F luorescent P rotein)
GMP	Společný prekurzor granulocytů a monocytů/makrofágů (G ranulocyte- M acrophage P rogenitor)
HEPES	Kyselina 4-(2-hydroxyetyl)-1- piperazinetansulfonová
Hsa	<i>Homo sapiens</i>

HSPCs	Hematopoetické kmenové a progenitorové buňky (H ematopoietic S tem P rogenitor C ells)
H3	H iston H3
H3K4Me3	H3K4 m etyl3
H3K9Ac	H3K9 a cetyl
ChIP	C hromatinová I munoprecipitace
IHC	I munohistochemie
IMDM	I scove's M odified D ulbeco M edium
LT-HSC	Dlouhodobé kmenové buňky krvetvorby (L ong- T erm H ematopoietic S tem C ell)
MEP	Společný progenitor erytrocytů a megakaryocytů (M egakaryocyte/ E rythrocyte P rogenitor)
miR-155	microRNA 155
MIR155HG	miR-155 H ost G ene
miRNA	microRNA
MDS	M yelodysplastický S yndrom
mmu	<i>mus mutulus</i>
MPP	M ultipotentní P rogenitorová buňka
mRNA	mediátorová (messenger) RNA
MYB	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NK buňky	Přirození zabíječi (N atural K iller)
OS	Celkové přežití (O verall S urvival)
PABP	poly(A)vázající protein (p oly(A) b inding p rotein)
PB	Periférní krev (P eripheral B lood)
PBMC	Mononukleární buňky z periférní krve (P eripheral B lood M ononuclear C ells)
PBS	Fosfátový pufr (P hosphate B uffered S aline)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (P olymerase C hain R eaction)
P/S	P enicilin/ S treptomycin
PE	Fykoerytrin (P hycoerythrin)
RAEB	Refrakterní anémie s nadbytkem blastů (R efractory A nemia with E xcess B lasts)
RISC	R NA I nduced S ilencing C omplex

RNA	R ibonukleová kyselina (a cid)
RNU44	R ibonucleolar RNA 44
RP	Červená pulpa (R ed P ulp)
RPM	Otáčky za minutu (R evolutions P er M inute)
RT-qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (R everse T ranscription q uantitative P olymerase C hain R eaction)
RT	Pokojová teplota (R oom T emperature)
SATB1	S pecial A T-rich sequence B inding protein 1
SD	Směrodatná odchylka (S tandard D eviation)
SEM	Standardní chyba průměru (S tandard E rror of the M ean)
siRNA	small interfering R NA
Sfpi1	S pleen focus forming virus p roviral i ntegration oncogene (<i>Mus musculus</i>)
SPI1 (PU.1)	S pleen focus forming virus p roviral i ntegration oncogene (<i>Homo sapiens</i>)
STAT3	S ignal transducer and a ctivator of t ranscription 3
ST-HSC	Krátkodobé kmenové buňky krvetvorby (S hort- T erm H ematopoietic S tem C ell)
URE	U pstream R egulatory E lement
UTR	Nepřekládaná oblast (U ntranslated R egion)
TGF- β	Faktor nádorového růstu β (T umor g rowth f actor β)
TLR	T oll like r eceptor
TNF- α	Faktor nádorové nekrózy α (T umor n ecrosis f actor α)
TRBP	TAR RNA vázající protein (T AR R NA b inding p rotein)
TSS	Místo transkripčního počátku (T ranscription S tart S ide)
WHO	Světová zdravotnická organizace (W orld H ealth O rganisation)
WP	Bílá pulpa (W hite P ulp)
Wt	Jedinec s puvodním fenotypem. (W ild t ype)

ABSTRAKT

Snížení hladiny PU.1 v hematopoetických kmenových a progenitorových buňkách (HSPCs) je primárním mechanismem pro rozvoj akutní myeloidní leukémie (AML) u myší s homozygotní delecí „upstream regulatory element“ (URE) genu *PU.1*. *p53* je tumor supresorový gen, který je často mutovaný u lidských hematologických malignit (včetně AML) a přispívá k jejich agresivitě; navzdory tomu jeho genetická delece nezpůsobuje u myší AML. Delece *p53* u myší *PU.1^{ure/ure}* (*PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}*) způsobuje agresivní formu AML se zkrácenou dobou celkového přežití. *PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}* progenitory exprimují signifikantně nižší hladinu PU.1. Zaměřili jsme se proto na mechanismy, jež za nepřítomnosti *p53* přispívají ke snižování hladiny PU.1 v *PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}* progenitorech. Nalezli jsme vliv onkogenů: Myb a jeho cíle mikroRNA miR-155 na downregulaci PU.1 u agresivní myší AML. Inhibicí onkogenů Myb nebo miR-155 *in vitro* dochází u AML progenitorů k znovuoobnovení hladin PU.1 a ztrátě leukemického buněčného růstu podobně jako při obnově exprese PU.1. Transientní potlačení exprese *p53* ukázalo, že dráha MYB/miR-155/PU.1 je cílem *p53*, která se aktivuje brzy po ztrátě *p53*. Deregulace MYB a miR-155 spojená s poklesem hladiny PU.1 byla také pozorována v lidské AML, což naznačuje, že nově objevená onkogenní dráha *p53*/MYB/miR-155/PU.1 může být zapojena do patogeneze lidské agresivní AML charakterizované mutací *p53*.

ABSTRACT

PU.1 downregulation within haematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) is the primary mechanism for the development of acute myeloid leukaemia (AML) in mice with homozygous deletion of the upstream regulatory element (URE) of *PU.1* gene. *p53* is a well known tumor suppressor that is often mutated in human haematologic malignancies including AML and adds to their aggressiveness; however its genetic deletion does not cause AML in mouse. Deletion of *p53* in the $PU.1^{ure/ure}$ mice ($PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}$) results in more aggressive AML with shortened overall survival. $PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}$ progenitors express significantly lower PU.1 levels. In addition to URE deletion we searched for other mechanisms that in absence of *p53* contribute to decreased PU.1 levels in $PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}$ mice. We found involvement of Myb and miR-155 in downregulation of PU.1 in aggressive murine AML. Upon inhibition of either Myb or miR-155 *in vitro* the AML progenitors restore PU.1 levels and lose leukaemic cell growth similarly to PU.1 rescue. The MYB/miR-155/PU.1 axis is a target of *p53* and is activated early after *p53* loss as indicated by transient *p53* knockdown. Furthermore, deregulation of both MYB and miR-155 coupled with PU.1 downregulation was observed in human AML, suggesting that MYB/miR-155/PU.1 mechanism may be involved in pathogenesis of AML and its aggressiveness characterized by *p53* mutation.

VŠEOBECNÝ ÚVOD

Krvetvorba

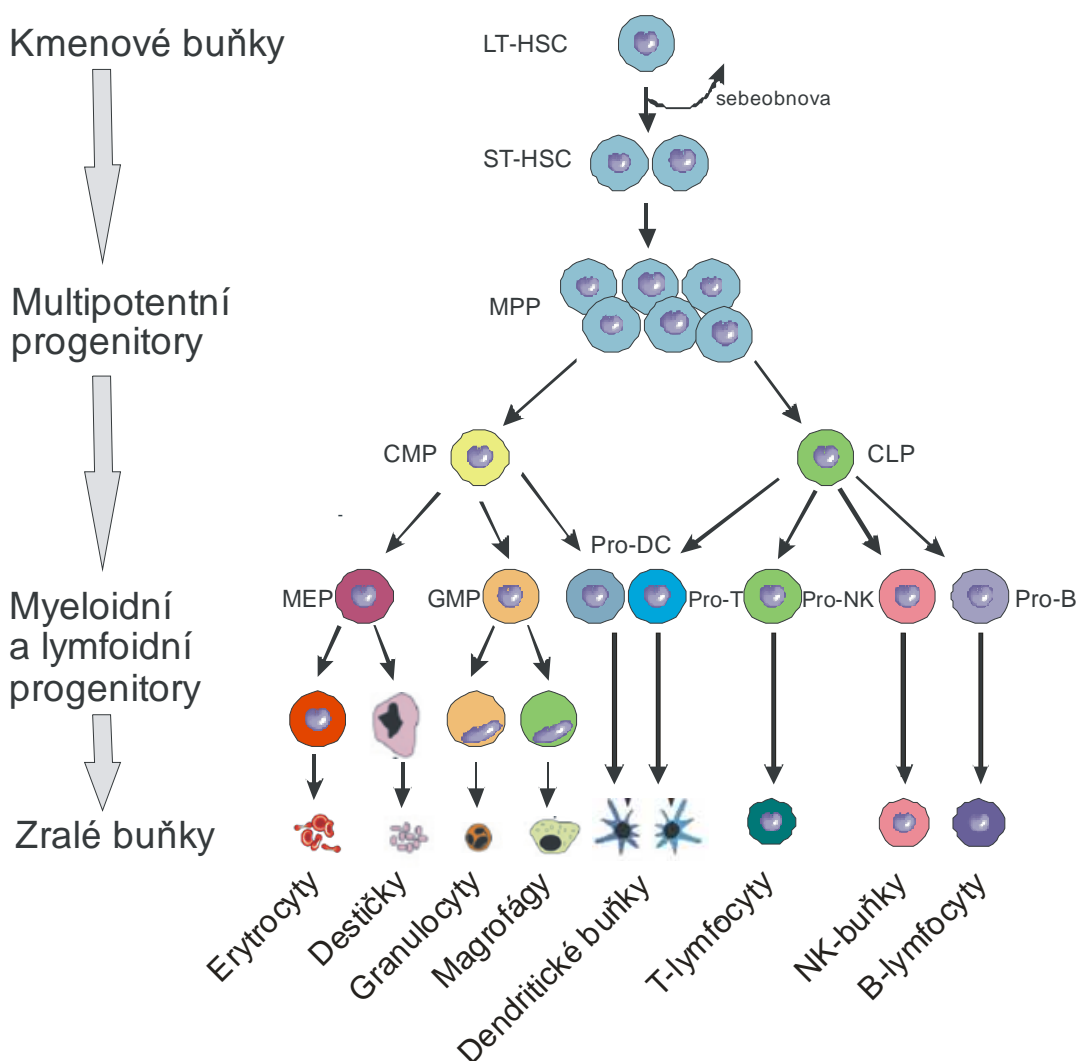
Krvetvorba (hematopoeza) je proces, množení, vyžívání a vyplavování krevních buněk z kostní dřeně do periférní krve. Zralé krevní buňky jsou diferencované a dále se již nedělí. Procesem krvetvorby se zajišťuje jejich neustálá produkce a obnovování za patologických stavů. Vznikající krevní element prochází víceetapovým procesem proliferace (dělení), diferenciace a zrání.

Obecné schéma diferenciace:

pluripotentní hematopoetická kmenová buňka (HSPC) → multipotentní buňka → progenitorová buňka → prekursorová buňka → plně diferencovaná buňka.

Všechny linie krevních buněk se vyvíjejí ze společné pluripotentní hematopoetické kmenové buňky LT-HSC (Long-Term Hematopoietic Stem Cell) (**Obrázek 1**). LT-HSC jsou buňky mající samoobnovovací schopnost, mohou plně obnovit krvetvorbu na déle než několik měsíců. Mohou se diferencovat do všech typů krevních buněk. Jsou důležité pro terapii. Z těchto buněk se dále vyvíjejí ST-HSC (Short-Term Hematopoietic Stem Cell), schopné jen krátkodobé sebeobnovy - mohou se dělit, ale dlouhodobě nemohou plně obnovovat samy sebe. (Domen et al., 1999; Passegué et al., 2003; Weissman, 2000). Diferenciací pluripotentních kmenových buněk vznikají *multipotentní progenitorové buňky* (MPP) (**Obrázek 1**), které prakticky nemají schopnost sebeobnovy (Morrison et al., 1997; Passegué et al., 2003). Diferenciací multipotentních buněk vzniká další generace buněk a to *buňky progenitorové*, které jsou schopné se rychle množit a dát tak vznik dalším progenitorovým buňkám. Na povrchu jejich membrán jsou exprimovány receptory pro hemopoetiny, růstové faktory, které spouští diferenciaci buněk. Progenitorové buňky existují dvojího druhu: lymfoidní progenitory (CLP) a myeloidní progenitory (CMP). Z progenitorových buněk vlivem růstových faktorů vznikají *buňky prekursorové* (**Obrázek 1**). Tyto buňky svým dělením vytvářejí jen unipotentní linii maturujících buněk vedoucí ke zralému krevnímu elementu. Část populace CLP opouští kostní dřeň a migruje do thymu, kde se dále

vyvíjejí unipotentní prekuzory T-lymfocytů a z části CLP, které zůstaly v kostní dřeni, se vyvíjejí prekuzory B-lymfocytů a NK (Natural Killer) buněk (Akashi et al., 1999; Kondo et al., 1997). CMP diferencují na MEP (společný progenitor erytrocytů a megakaryocytů) a GMP (společný prekuzor granulocytů a monocytů/makrofágů). Z megakaryocytů vznikají krevní destičky (Akashi et al., 2000). Dendritické buňky diferencují z CMP i CLP (Manz, 2001; Traver, 2000). Pro každý typ krvinky existuje jedna prekursorová buňka. Všechny zmíněné buňky se liší svými povrchovými molekulami (Passegué et al., 2003).



Obrázek 1: Vývoj jednotlivých linií krevních buněk. Krevní buňky se vyvíjejí ze společné kmenové buňky (HSC), která diferenciuje do multipotentní progenitorové buňky (MPP). Progenitorové buňky jsou dvojího druhu: lymfoidní progenitory (CLP) a myeloidní progenitory

(CMP). Z progenitorových buněk vznikají buňky prekursorové, které svým dělením vytvářejí jen linii vedoucí ke zralé krevní buňce (obrázek převzat a pozměněn (Passegué et al., 2003)).

Akutní myeloidní leukémie (AML)

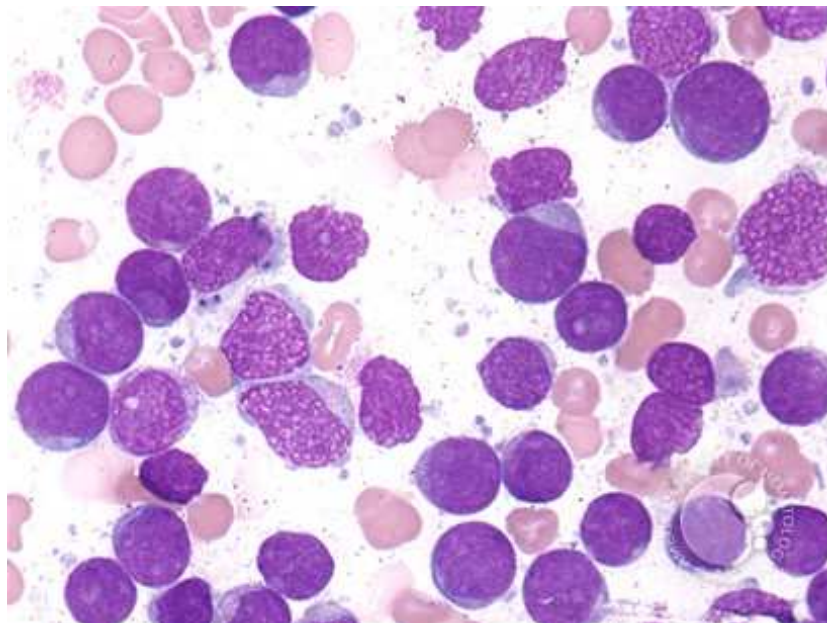
Leukemie je zhoubné (nádorové) onemocnění postihující hematopoetický systém, při němž dochází v kostní dřeni k bujení a hromadění určitého typu krevních buněk, zejména jejich nezralých vývojových stádií, a k jejich následnému nekontrolovanému vyplavování do krve. Leukémie se rozděluje na *akutní leukemii* (progenitory nejsou schopné vývoje v plnohodnotnou buňku, mají blok a ztrátu diferenciaci, onemocnění má rychlejší průběh v řádu dnů či měsíců) a *chronickou leukemii* (progenitory mohou částečně diferencovat ve zralé buňky, onemocnění má pomalejší průběh v řádu měsíců či let). Dále se dle typu postižených krvetvorných buněk dělí na *lymfocytární leukemii* - postihující lymfocytární řadu, a *myeloidní leukemii* - postihující myeloidní řadu.

Epidemiologie a definice AML

Akutní myeloidní leukémie (AML) tvoří 80 % akutních leukemií u dospělých pacientů. Jedná se zejména o onemocnění starších lidí (medián věku při stanovení diagnózy je 65 let). Její incidence je nejvyšší v západním světě a typicky narůstá s věkem (kdy je vyšší výskyt AML s myelodysplastickými změnami). Ve věku 40 let je AML diagnostikována u 1 pacienta na 100 000 obyvatel za rok, ale ve věku nad 75 let již u 15-17 pacientů (Karas, 2011; Hematologie - Adam a kolektiv, 2008). Průměrná incidence výskytu AML v celosvětové populaci je 3,6 případů na 100 000 obyvatel (výskyt je častější u mužů než u žen). Na základě rizikových faktorů se odvíjí prognóza pacientů, která se vzhledem k intenzivní chemoterapii, alogenní transplantaci krvetvorných buněk a značnému zlepšení podpůrné péče za posledních několik desetiletí významně zlepšila u mladších pacientů s AML (Juliussen et al., 2009). Obecně lze konstatovat, že remise dosáhne 60-80 % pacientů mladších 55–60 let, ve starších věkových skupinách jen asi polovina pacientů. Celkové tříleté přežití se u mladších pacientů pohybuje kolem 30 %, u starších maximálně 15 %. Po provedení

allogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk přežívá po 3 letech více než 50 % pacientů (Karas, 2011; Hematologie - Adam a kolektiv, 2008).

AML je klonální expanze nezralých krvetvorných buněk, které tvoří více než 20% jaderných buněk v kostní dřeni (**Obrázek 2**). Je charakterizovaná proliferací a akumulací nezralých (leukemických) myeloidních prekursorů a porušenou tvorbou normálních krvetvorných buněk (Griffin et al., 1986; Stone et al., 2004).



Obrázek 2: AML s nezralými myeloidními blasty, které mají vysoký jaderný poměr vůči cytoplazmatickému poměru a obecně postrádají granule. (obrázek převzat: ASH image bank (<http://imagebank.hematology.org/AssetDetail.aspx?AssetID=1177&AssetType=Asset>))

Diagnóza, klasifikace a léčba AML

K charakteristickým nálezům u pacientů s AML patří leukocytóza v periferní krvi s vyplavováním blastů, může být ale i přítomen nedostatek elementů (cytopenie). Tyto změny v krevním obraze vedou k indikaci vyšetření kostní dřene. Pro diagnózu AML svědčí nález alespoň 20 % leukemických blastů. K základním vyšetřením umožňujícím klasifikaci AML patří imunofenotypizace, cytogenetika a molekulárně genetické vyšetření kostní dřene a fytochemie (Hematologie - Adam a kolektiv, 2008).

Prognóza pacientů závisí na podtypu AML (rozdělení na základě laboratorních testů), věku pacienta a přítomnost rizikových změn v karyotypu (chromozomální nebo genové abnormality). Klasifikace AML je velmi složitá. První dělení je na *de novo*

AML nebo sekundární AML (například: tAML - AML po předchozí chemoterapii či radioterapii). Mezi sekundární AML se jasně vyčleňuje skupina AML vznikající již v chronicky poškozené kostní dřeni, nejčastěji na bázi myelodysplastického syndromu (MDS/AML). Je mnohem častěji diagnostikována u pacientů ve vyšším věku, vyznačuje se vysoce nepříznivou prognózou, což má vliv na volbu léčebných postupů (Byrd et al., 2002; Juliusson et al., 2009).

Dva klasifikační systémy pro rozdělení AML do podskupin jsou paralelně používány. Prvním je **FAB klasifikace** (Francouzsko-Americko-Britská klasifikace) z roku 1976, která rozděluje AML do 9 skupin M0-M7 (**Tabulka 1**) podle buněčné-liniové příslušnosti nádorové populace, procenta blastických buněk a stupně buněčné diferenciaci. FAB klasifikace AML je založena na morfologickém a cytochemickém hodnocení blastů.

Tabulka 1: FAB klasifikace AML:

Podtyp	Název
M0	AML s minimální myeloidní diferenciací
M1	AML bez vyžrávání
M2	AML s vyžráváním
M3	Akutní promyelocytární leukémie
M4	Akutní myelomonocytární leukémie
M4 eos	Akutní myelomonocytární leukémie s eosinofilií
M5	Akutní monocytární leukémie
M6	Akutní erytroleukémie
M7	Akutní megakaryoblastická leukémie

Podtypy M0-M5 vznikají v prekurzorech bílých krvinek. Podtyp M6 vzniká v rané formě červených krvinek, zatímco M7 v rané formě buněk diferencujících do destiček.

Druhým systémem klasifikace AML je **WHO** (World Health Organisation) **klasifikace** používaná od roku 2001, která zohledňuje kromě morfologie a cytochemie i znaky cytogenetické, molekulárně genetické a imunofenotypizační a současně i další prognosticky a diagnosticky významné fúzní geny nebo mutace (Hematologie - Adam

a kolektiv, 2008). Toto rozdělení (**Tabulka 2**) odráží rozdílnou leukemogézu jednotlivých typů AML, což se odráží i v odlišném terapeutickém přístupu a prognóze.

Tabulka 2: WHO klasifikace AML (převzato: hematologický atlas <http://www.leukemia-cell.org/cz/internetovy-hematologicky-atlas/aml/>)

AML s rekurentními genetickými abnormalitami

AML s translokací t(8;21)

AML s inverzí chromosomu 16 nebo translokací t(16;16)

akutní promyelocytární leukémie, tj. AML s translokací t(15;17)

AML s translokací t(9;11)

AML s translokací t(6;9)

AML s myelodysplastickými změnami

Postterapeutické AML (související s předchozí léčbou)

AML blíže nespécifikované

AML s minimální diferenciací

AML bez vyžrávání

AML s vyžráváním

akutní myelomonocytární leukémie

akutní monoblastická a monocytární leukémie

akutní erytroleukémie

akutní megakaryoblastická leukémie

akutní basofilní leukémie

akutní panmyelóza s myelofibrózou

Myeloidní sarkom

Myeloproliferativní onemocnění související s Downovým syndromem

přechodná abnormální myelopoéza

myeloidní leukemie spojená s Downovým syndromem

Neoplasma z blastických plasmocytoidních dendritických buněk

Jedním z nejdůležitějších faktorů, který v případě stanovení diagnózy AML ovlivňuje prognózu onemocnění, je přítomnost genetických aberací v leukemických blastech. Studium těchto chromozomálních a genových změn pomáhá rozdělovat AML

do skupin s příznivými, intermediárními a nepříznivými cytogenetickými nálezy (Byrd et al., 2002; Grimwade et al., 1998).

- *Chromozomální abnormality* jsou prvním opěrným bodem v prognóze onemocnění (Appelbaum et al., 2006).

Příznivé chromozomální změny:

- translokace t(8;21) (M2)
- inverze inv(16) (M4 eos)
- translokace t(16;16)
- translokace t(15;17) (M3)

Nepříznivé chromozomální změny:

- delece části chromozomu 5 nebo 7
- komplexní chromozomální aberace (abnormalita postihující nejméně 3 chromozomy)

- *Genové mutace* jsou dalším bodem zájmu. Pacienti s danou genovou mutací můžou mít relativně příznivou (mutace genu NPM1) nebo relativně nepříznivou (mutace genu FLT3) prognózu.
- *Věk pacienta*. Starší pacienti (nad 60 let) mají obecně nepříznivou prognózu oproti mladším pacientům. Důvodem je řada nepříznivých genetických aberací v leukemických blastech a nemožnost zahájení intenzivní chemoterapie z důvodu dalších závažných onemocnění a špatného celkového stavu pacienta již v době diagnózy (Derolf et al., 2009; Juliusson et al., 2009).

Zahájení léčby vždy předchází rozhodnutí, zda pacient bude léčen s kurativním nebo paliativním záměrem. Kurativní léčba je zahájena indukční chemoterapií (obvykle kombinace antracyklinu a cytarabinu) a jejím cílem je navodit kompletní remisi nemoci. Po dosažení remise (není-li zachycen leukemický klon v kostní dřeni po reparaci) následuje udržovací (konsolidační) léčba, jejíž složení se liší v jednotlivých prognostických skupinách. Pacienti s vysokým rizikem jsou směřováni k allogenní transplantaci krvetvorných kmenových buněk. Transplantace využívá kombinace vysokodávkované chemoterapie a imunologicky navozené reakci štěpu proti leukemii (Appelbaum, 2001). U starších pacientů neúnosných vysokodávkované léčby jsou zkoušeny nové léčebné látky (5-azacytidin) indikované ve skupině AML s myelodysplastickými změnami. K paliativní léčbě se používá nízkých dávek cytostatik - cytarabinu, hydroxyurey a je poskytnuta podpůrná péče. Vzhledem k agresivitě neléčené AML je tato léčba zatížena vysokou mortalitou, ale při nepříznivých

výsledcích standardní intenzivní léčby je pacient alespoň uchráněn její toxicitou (Juliussen et al., 2009).

Mechanismus a geny odpovědné za vznik AML

Mechanismus vzniku AML a četné rozdíly v agresivitě onemocnění jsou přes intenzivní výzkum dosud nejasné (J. C. Y. Wang & Dick, 2005). Jedná se o vícestupňový patologický proces, který spočívá v navazujících minimálně dvou mutacích, během nichž dochází k postupnému narušení nejméně dvou procesů – proliferace a/nebo přežívání a diferenciace. Teprve narušení těchto procesů má za následek vznik agresivního leukemického klonu v kostní dřeni, který je následně vyplavován do krve. Tento leukemický klon AML obsahuje malý počet rychle proliferujících prekurzorů, které produkují velké množství dělících se leukemických myeloblastů (Bonnet et al., 1997; Lapidot et al., 1994; Wang & Dick, 2005), které potlačují fyziologickou krvetvorbu, a dochází k rychlému poklesu počtu všech normálních krvinek v periferní krvi, což se následně projeví cytopeniemi: anémií, neutropenií a trombocytopenií.

Je známo, že radiační záření, kancerogenní chemikálie (herbicidey, pesticidy, benzen) i cytostatika mohou indukovat vznik této nemoci. Ve vlastní patofyziologii vzniku AML však mají zásadní význam genetické změny, jak už bylo zmíněno zejména chromozomální přestavby. U AML jsou prokazatelné translokace, za vzniku fúzních genů, jejichž součástí jsou často geny pro transkripční faktory. Důsledkem takto změněných transkripčních faktorů je deregulace vývoje kmenové krvetvorné buňky a vznik leukémie (Hematologie - Adam a kolektiv, 2008).

Geny, které by se mohly podílet na progresi AML, lze rozdělit do dvou kategorií: *onkogeny* (např. Myb, Myc, miR-155, Bcl-2) a tumor supresorové geny – tzv. *antionkogeny* (např. p53, PU.1). Onkogeny se od nádorových supresorových genů liší především tím, že onkogeny vznikají v somatických buňkách mutací (aktivací) protoonkogenů (= strukturní geny, jejichž produkt se podílí na regulaci dělení buňky a její diferenciaci), což se projevuje zvýšenou a nekontrolovatelnou proliferací buněk – neboli nádorovou transformací buněk. Nádorové supresorové geny naopak tlumí buněčné dělení, účastní se oprav DNA a některé z nich stimulují diferenciaci a apoptózu buněk (Gatz & Wiesmüller, 2006; Vousden & Prives, 2009). Dojde-li k jejich vyřazení

z funkce, projeví se to zvýšenou proliferací buněk, poškozením DNA a inhibicí jejich diferenciaci a apoptózy (Horn & Vousden, 2007). Příčina vzniku leukemie je multifaktoriální proces, kde vznikají mutace jak v protoonkogenech, tak i v tumor supresorových genech. Pro leukemické buňky není rozhodující rychlost buněčného dělení (dokonce může být i nižší), nýbrž ztráta schopnosti diferenciaci při zachované proliferaci.

Antionkogeny v AML

Antionkogeny (zvané taky tumor supresorové geny nebo recesivní onkogeny) mají zásadní úlohu v maligním procesu. Jejich produkty regulují buněčné dělení, potlačují proliferaci buněk a udržují buňku ve stádiu klidu (G0). Delece obou alel supresorového genu, bodová mutace nebo inaktivace jimi kódovaného proteinu vede k poruše kontroly buněčného cyklu a ke vzniku malignit.

Transkripční faktor PU.1

Struktura

Nádorový supresor PU.1 je jedním z genů odpovědných za vznik AML (Dahl et al., 2003). Jedná se o transkripční faktor ETS rodiny kódovaný genem *Spil* (*Sfpil*, *PU.1*), který se nachází na myším chromozomu 2 (resp. na 11 chromozomu u lidí v oblasti 11q22) (Klemsz et al., 1990; Moreau-Gachelin et al., 1988). PU.1 obsahuje 3 různé funkční domény (**Obrázek 3**). Na C-koncovém úseku PU.1 se nachází konzervovaná ETS doména (DNA vazebnou doménu) skládající se ze tří α -šroubovic a čtyř β -listů, které dohromady vytvářejí konfiguraci typu šroubovice-otáčka-šroubovice (Kodandapani et al., 1996). ETS doména proteinu PU.1 rozpoznává a váže sekvenční DNA s vysokým obsahem purinových bází obsahující specifický vazebný motiv GGA(A/T) (Graves et al., 1998; Yamamoto et al., 1999). Na N-koncovém úseku PU.1 se nachází trans-aktivační doména, která se dále dělí na oblasti bohaté na kyselé aminokyseliny a glutamin. Střední úsek molekuly PU.1 tvoří PEST doména, která je bohatá na přítomnost aminokyselin: prolinu, glutamátu, serinu a treoninu (Klemsz & Maki, 1996). C-koncová ETS doména i N-koncová trans-aktivační doména PU.1 jsou

nezbytné pro zajištění normální myeloidní diferenciace, jejich delece (myší „knockout“) je u myší letální – den E18.5, skrze zablokování vývoje většiny krevních buněk (Scott et al., 1994). Protein PU.1 je post-translačně modifikován fosforylací serinu jak v N-koncové transaktivační doméně tak i v PEST doméně. Všechny zmíněné domény PU.1 jsou schopné fyzicky se účastnit protein-proteinových interakcí, které hrají klíčovou roli při zprostředkování funkce PU.1 jako transkripčního faktoru.

PU.1/Spi-1



Obrázek 3: Struktura proteinu PU.1. Na C-koncovém úseku PU.1 obsahuje DNA vazebnou ETS doménu, na N-konci transaktivační doménu a střední úsek molekuly tvoří PEST doména (vytvořeno RNDr. Pavlem Burdou, PhD)

Hladina exprese PU.1 a její regulace

PU.1 funguje jako nádorový supresorový gen (Klemsz et al., 1990; Moreau-Gachelin et al., 1988). Exprese PU.1 mRNA a proteinu začíná uvnitř krvetvorných kmenových a progenitorových buňkách (HSPCs). Výše hladiny exprese PU.1 je klíčová pro diferenciaci CMP a CLP progenitorů (Akashi et al., 2000; Nutt et al., 2005; Oikawa et al., 1999). Nejvyšší hladina exprese PU.1 aktivuje přednostně monocytární diferenciaci (Laslo et al., 2006), střední hladina vede k produkci granulocytárně-makrofágových progenitorů (Dahl et al., 2003; DeKoter et al., 2007) a nízká hladina PU.1 v buňce aktivuje transkripční program B lymfocytů (Back et al., 2005). Hladiny PU.1 jsou tedy velmi důležité pro řízení buněčného vývoje a pro tvorbu zcela specifických typů buněk, jako jsou makrofágy, granulocyty, nebo lymfocyty. Snížení hladiny PU.1 v prekurzorových buňkách vede k nedostatečné aktivaci pro-diferenciačních programů a ke vzniku leukémie u myší i u lidí, a také předvídá špatnou prognózu (Cook et al., 2004; Koschmieder et al., 2005; Rosenbauer et al., 2004).

Úroveň hladiny PU.1 je regulována vazbami různých transkripčních faktorů, včetně autoregulačního působení PU.1 v promotorové oblasti *PU.1*, pomocí epigenetických mechanismů na úrovni chromatinu a rovněž post-transkripčními procesy odehrávajícími se v oblasti URE *PU.1* (upstream regulatory element, -14 kb před transkripčním startem).

Proximální promotor genu *PU.1* obsahuje vazebná místa pro protein PU.1 čímž umožňuje autonomní regulaci svojí vlastní exprese a exprese cílových genů PU.1 (Chen et al., 1995). Taktéž se zde nacházejí vazebná místa pro řadu transkripčních faktorů (Oct-1, Sp1, Gata-1 a Spi-B), které se podílejí na regulaci (aktivaci nebo represi) transkripce genu *PU.1* během hematopoetického vývoje. Tato pozitivní autoregulace představuje společně s vazbou transkripčního faktoru Sp1 do vazebného místa promotoru *PU.1* hlavní mechanismus promotorem-řízené exprese PU.1 v myeloidních buňkách (H. Chen et al., 1996).

Proximální promotor *Spi1* sam o sobě však nestačí k řízení exprese genu *PU.1*, je nezbytná také jeho kombinace se vzdálenou regulační oblastí URE (upstream regulatory element). Tato regulační oblast se nachází v pozici 5' k místu transkripčního počátku ve vzdálenosti cca -14 kb u myšního a -17,3 kb u lidského počátku genu (Y. Li et al., 2001). Oblast URE zabezpečuje nasednutí RNA polymerasy II na promotor genu (Hoogenkamp et al., 2007; Steidl et al., 2007) a zodpovídá za regulaci zhruba 80% exprese PU.1 (Rosenbauer et al., 2004). Oblast URE se skládá ze dvou vysoce konzervovaných homologních oblastí – proximální (3') a distální (5') oddělených evolučně nekonzervovanou sekvencí (N Bonadies et al., 2010; Okuno et al., 2005). Obě konzervované podoblasti úseku URE obsahují řadu vazebných míst pro různé transkripční faktory: Elf-1, FLI-1, Cebpα, Runx-1/AML1 a Nf-κb (N Bonadies et al., 2010; Hoogenkamp et al., 2009; Okuno et al., 2005; Yeaman et al., 2007) a tyto vazby jsou liniově specifické. To znamená, že v B buňkách se do oblasti URE váže jiná skupina transkripčních faktorů než v myeloidních buňkách (Hoogenkamp et al., 2007). V oblasti proximální URE se nalézá vazebné místo pro PU.1. Prostřednictvím tohoto místa může protein PU.1 autoregulačně řídit svoji vlastní expresi (Okuno et al., 2005).

Epigenetické změny na úrovni chromatinu taktéž napomáhají regulaci transkripce genu *PU.1* a dokonce předcházejí vazbě PU.1 a dalších faktorů na jejich vazebné sekvence. Tyto epigenetické procesy se odehrávají na histonech (molekuly

mající vliv na uspořádání DNA a prostřednictvím svých modifikací regulují genovou expresi a další buněčné pochody) v oblasti URE, kde dochází například k acetylaci (Ac) na devátém a trimetylaci (Me₃) na čtvrtém lysinu (K) histonu H3 (Hoogenkamp et al., 2007). Modifikace histonu H3K9Ac a H3K4Me₃ asociuje s transkripčně aktivním chromatinem v místě jejich působení (Barski et al., 2007; Kouzarides, 2007). K aktivaci transkripce dochází dvěma mechanismy, a to přinesením chromatin-remodelačních enzymů (ATPasy a další) na DNA a také přímým přerušením kontaktu mezi histony v sousedních nukleosomech nebo mezi histony a DNA (acetylace neutralizuje kladný náboj lysinu). Tím dochází k rozvolnění chromatinových struktur vyššího řádu a zpřístupnění DNA pro transkripční faktory a RNA polymerázu (Kouzarides, 2007). Epigenetický stav chromatinu v regulačních úsecích genu *PU.1* je liniově specifický. Při vývoji B a T lymfocytů získává chromatin regulačních oblastí genu *PU.1* alternativní strukturu než při vývoji monocytů a granulocytů (Hoogenkamp et al., 2007).

Hladina *PU.1* je také regulována post-transkripčními mechanismy. Příkladem negativní regulace je inhibice translace *PU.1*, při níž dochází k vazbě onkogenu miR-155 (viz kapitola onkogeny....) na 3'konec nepřekládaného úseku mRNA transkriptu *PU.1* (Vargova et al., 2011; Vigorito et al., 2007). Jelikož jiné mikroRNA neváží *PU.1*, je zprostředkovaná inhibice *PU.1* s miR-155 specifická.

Změny v genu *PU.1* a jejich vliv na patogenezi AML

Genetické a epigenetické změny v genu *PU.1* často přispívají k patogenezi akutní myeloidní leukémie (AML). Abnormální hladiny exprese *PU.1* byly pozorovány jak ve specifických myších modelech AML získaných genetickou manipulací na úrovni embryonálních kmenových buněk (Cook et al., 2004; Rosenbauer et al., 2004; Walter et al., 2005), tak i u pacientů s AML (Bonadies et al., 2010; Mueller et al., 2002).

Narušení některé z domén genu *PU.1* nebo delece genu *PU.1* (*Sfpi-1*^{-/-}) je u myši letální – den E18.5, vede k poškození krvevotvorby, kde byla pozorována řada morfologických a funkčních defektů nebo k úplnému vymizení prekurzorů monocytů, granulocytů, B a T lymfocytů (Anderson et al., 1998; DeKoter et al., 1998; Klemsz & Maki, 1996; McKercher et al., 1996; Nerlov & Graf, 1998; Scott et al., 1994). Delece regulační oblasti URE nebo kondicionální delece genu *PU.1* (Metcalf et al., 2006) není pro myši letální a zdá se být ideálním modelem pro studium krvevotvorby myeloidních

buněk u myši. Delece URE pouze u jedné z alel (heterozygotní myši s expresí PU.1 okolo 50%) nemá vliv na fenotyp (myši vypadají normálně), ale delece URE u obou alel myšního genu *PU.1* vede ke snížení exprese PU.1 v kostní dřeni o 80% (Rosenbauer et al., 2004). PU.1 protein je syntetizován pouze v malém množství a následná analýza ukázala, že jeho snížená hladina je schopna iniciovat v myších AML. Během 2-3 měsíců dochází k propuknutí preleukemické fáze (vyznačuje se dvojnásobným zvýšením c-Kit⁺ prekurzorů, Gr-1⁺ granulocytů a splenomegalií) a následně dochází k rozvoji AML (vyznačuje se klonální akumulací myeloidních c-Kit⁺Mac-1^{low}Gr-1^{low} blastů). Tento myší model AML vykazuje klonální rysy charakterizované opakujícími se chromozomálními abnormalitami a je retransplantabilní do imunodeficitních příjemců (Rosenbauer et al., 2004).

Mutace genu *PU.1* se vyskytují i v lidských leukemických blastech a podobně jako myeloidní buňky odvozené od Sfpi-1^{-/-} myši jsou blokovány v počáteční fázi myeloidní diferenciace. PU.1 je mutovaný asi u 7 % pacientů s AML (z kohorty 126 pacientů japonské populace) s podtypem M0, M4 nebo M5 FAB klasifikace (Mueller et al., 2002). Mutace v DNA-vazebné doméně mají za následek jak narušení vazby PU.1 na DNA, tak i ztrátu schopnosti aktivovat důležité cílové geny PU.1 prostřednictvím vazby s dalšími transkripčními faktory (Mueller et al., 2002). Translokace t(8;21) v primárních buňkách pacientů s AML (Vangala et al., 2003) i translokace t(15;17) v buňkách promyelocytické leukémie (Mueller et al., 2006) má za následek výrazné snížení hladiny PU.1, které může být asociováno se vznikem AML. U 3,3 % pacientů s AML (kohorta 120 pacientů švýcarské populace) je exprese PU.1 potlačena změnami v sekvenci (polymorfismy) vazebného místa pro NF-κB v distální regulační oblasti genu *PU.1*. (Bonadies et al., 2010). Zatímco heterozygotní delece v oblasti URE, způsobující snížení exprese PU.1, se vyskytuje u AML podtypu M2 (Bonadies et al., 2010). Bodová mutace v distální regulační oblasti URE, vedoucí k neschopnosti regulovat PU.1 prostřednictvím chromatin remodelujícího proteinu SATB1, se vyskytuje u agresivních forem AML (Steidl et al., 2007).

"Strážce genomu" p53

Nádorový supresorový gen *Trp53* je klíčovým regulačním faktorem, který monitoruje poškození DNA. Více než polovina všech lidských nádorů (nádory plic, mozku, jater, prsu, tlustého střeva, vaječníků, jícnu) (Epstein et al., 1998; Hollstein et al., 1991) obsahuje delecii nebo bodovou mutaci genu *Trp53*, proto by se tento antionkogen mohl podílet i na progresi hematologických onemocnění. p53 patří mezi prognosticky nejdůležitější mutované geny u hematologických onemocnění.

Struktura

Gen *Trp53* lokalizovaný na krátkém rameni chromozomu 17 (oblasti, která je často detekována u nádorových onemocnění) kóduje jaderný protein p53, který obsahuje 5 základních domén (**Obrázek 4**) (Bode & Dong, 2004; Yoshida et al., 2009). Na N-koncovém úseku se nacházejí hned dvě domény: trans-aktivační doména potřebná pro aktivaci transkripce a obsahující vazebné místo pro protein Mdm2, který inhibuje aktivitu p53 a SH3 doména bohatá na prolin. V obou doménách dochází k postranlačním modifikacím (převážně fosforylaci a acetylaci) důležitým pro stabilizaci a aktivaci p53. Střední úsek tvoří DNA-vazebná doména, kde se uskutečňuje většina interakcí mezi p53 a jeho cílovými proteiny. Tato část je nejčastěji mutovanou oblastí p53 (Olivier et al., 2004). Na C-koncovém úseku p53 se nachází tetramerizační doména nezbytná pro dimerizaci (p53 vytváří dimery dvou-dimerů), doména pro jaderný lokalizační signál (NLS) a jaderný exportní signál (NES) (Stommel et al., 1999) a regulační doména (neboli nespecifická DNA-vazebná doména), která se váže na poškozenou DNA a tím aktivuje střední DNA-vazebnou doménu p53.

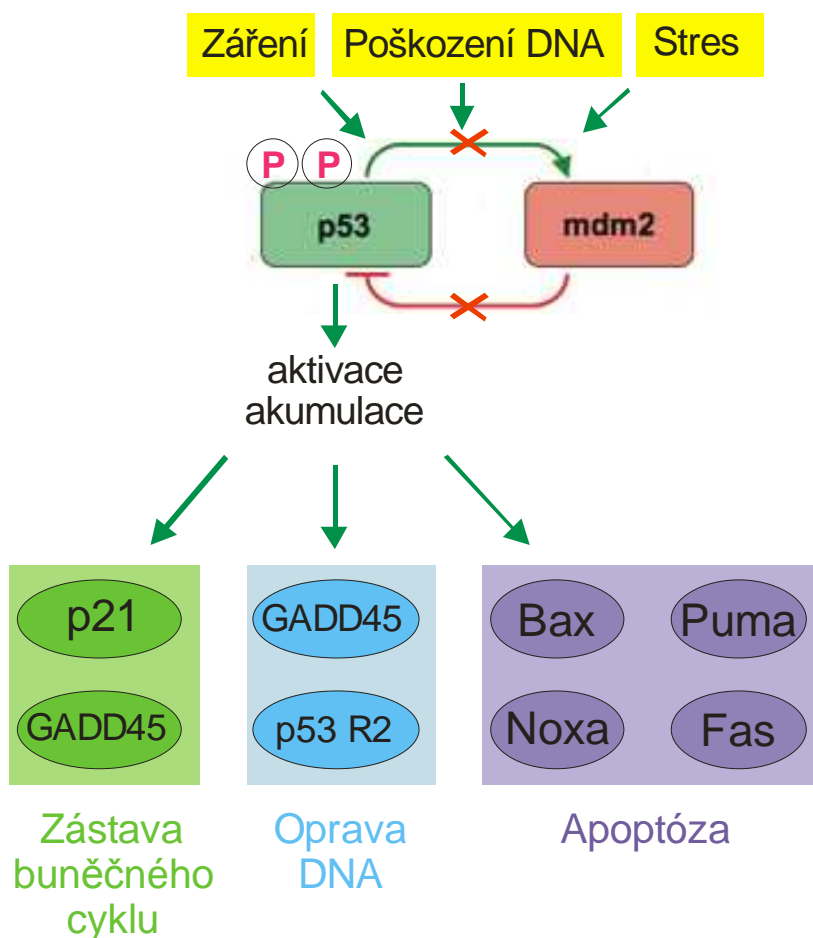


Obrázek 4: Struktura proteinu p53. Na N-koncovém úseku p53 obsahuje transaktivační a SH3 doménu, ve střední části DNA-vazebnou doménu a na C-konci obsahuje tetramerizační, NLS, NES a regulační doménu (obrázek pozměněn z (Bode & Dong, 2004)).

Biologická funkce proteinu p53

p53 hraje ústřední roli v prevenci rozvoje nádorové transformace prostřednictvím aktivace buněčné odpovědi/smrti na stresový signál či poškození DNA (Horn & Vousden, 2007). Hladina proteinu p53 je v normálních buňkách prakticky nedetekovatelná, vyskytuje se pouze v nízkých koncentracích nebo v transkripčně inaktivní formě. Vlivem stresových signálů (UV-záření, rentgenové záření, oxidativní stres, osmotický šok, zvýšená teplota, poškození membrány a další) (**Obrázek 5**) dojde k poškození úseků DNA (zlomy), které jsou rozpoznány C-koncovou regulační doménou p53. Následně dochází k postranlačním modifikacím, převážně k fosforylaci a aktivaci střední DNA-vazebné domény (Oren, 1999). Takto aktivovaný p53 reguluje expresi celé řady svých cílových genů (**Obrázek 5**), například genu kódujícího protein p21. Jeho zvýšená hladina pozastavuje buněčný cyklus na přechodu mezi G1/S fází, dokud není poškozené místo opraveno (Albrechtsen et al., 1999; Hollstein et al., 1994; Levine, 1997). Pokud není reparace možná, dochází k aktivaci pro-apoptotických genů: Bax, Noxa, Puma a vyvolání apoptózy (Miyashita & Reed, 1995; K. Nakano & Vousden, 2001; Oda, 2000). Avšak některé geny působí anti-apoptoticky, například produkt genu *Bcl-2*. Navození apoptózy pak závisí na poměru těchto dvou proteinů: Bcl-2/Bax. Apoptóza inhibuje proces přechodu buněk do nádorového stavu, pokud však Bcl-2 protein apoptóze zabrání, buňky přežijí. Se vzrůstající hladinou p53 v buňce se zvyšuje i hladina negativního regulátoru p53 - proteinu Mdm2, který vazbou na N-koncovou trans-aktivační doménu p53 ubiquitinuje a přesouvá ho z jádra do cytoplasmy, čímž inhibuje jeho aktivitu a dochází k degradaci p53 (Appella & Anderson, 2001; Kubbutat et al., 1998; Oren, 1999; Ryan et al., 2001).

p53 má tedy celou řadu biologických aktivit, které přispívají k jeho roli v potlačení nádoru (nádorové supresorové aktivitě), včetně jeho schopnosti vyvolat zastavení buněčného cyklu, diferenciaci, apoptózu, buněčnou senescence a schopnost omezit aberantní sebeobnovu buněk (Meek, 2009; Zhao et al., 2010; Zilfou & Lowe, 2009).



Obrázek 5: Aktivace p53 a stimulace jeho cílových genů. Poškozením DNA dochází k fosforylaci p53, rozrušení interakce mezi Mdm2 a p53 a k akumulaci p53. Stimulací cílových genů pro p53 dochází k zastavení buněčného cyklu a následné reparaci DNA nebo k navození apoptózy (obrázek upraven z webových stránek http://p53.free.fr/p53_info/p53_Pathways.html).

Mutace genu p53 – myší modely, frekvence a výskyt u AML

Mutace p53 a tím inaktivace jeho funkcí umožňuje buňce pokračovat v buněčném dělení a vyhnout se apoptóze. Dochází ke genetické nestabilitě, která umožňuje akumulaci mutací.

Na myších modelech s mutací genu p53 bylo pozorováno, že funkce tumor supresoru p53 není potřebná pro normální myší vývoj. Homozygotní myši s touto mutací přežívají a vypadají zcela normálně v porovnání s wt, ale zároveň jsou velmi náchylné k tvorbě solidních nádorů, převážně lymfomů (Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994). Pro zjištění, zda ztráta p53 má i leukemický efekt, byly vytvořeny různé myší modely s delecí p53 v kombinaci s dalšími defekty - mutací onkogenu K-ras (častá

mutace u AML, podporující proliferaci) (Johnson et al., 2001; Zhao et al., 2010) nebo deregulací onkogenu Myb a Myc (Hermeking et al., 1994; Mannefeld et al., 2009; Tanikawa et al., 2000). p53 inaktivace spolu s aktivací onkogenního K-ras stimuluje vznik agresivní AML. Ztráta p53 umožní myeloidním progenitorovým buňkám, které exprimují onkogenní K-ras, získat schopnost neomezené sebeobnovy a stanou se z nich iniciační buňky leukémie (Zhao et al., 2010).

Mutace v úseku, kterým se p53 váže k DNA, vede ke ztrátě funkce proteinu p53 vázat se na jednořetězcové úseky DNA, a neschopnosti interagovat se svými cílovými geny. Důsledkem toho buňka vstupuje do G1 a S fáze a dochází k replikaci DNA, proliferaci, přežití, genomové nestabilitě a progresi nádoru (Bartkova et al., 2005). Frekvence mutací genu pro p53 je u hematologických onemocnění poměrně nízká a souvisí se stádiem onemocnění (Guinn et al., 1997), například 10-15 % pacientů s AML vykazují kratší přežití a chemorezistenci (Fenaux et al., 1992; Haferlach et al., 2008; Hu et al., 1992; Nakano et al., 2000; Trecca et al., 1994; Wattel et al., 1994; Zhao et al., 2010). Mutace p53 je důležitým faktorem (s ohledem na věk a změny v karyotypu, které samy o sobě zhoršují prognózu) pro prognózu onemocnění AML, MDS a CLL (Fenaux et al., 1992; Christiansen et al., 2001; Parry, 1997; Wattel et al., 1994) a je dokonce považován za nejvýznamnější prognostický faktor u skupiny pacientů mladších 60 let (Nakano et al., 2000). Pro úplnou ztrátu funkce nádorového supresoru (tzv. ztrátu heterozygotnosti) musí dojít k somatické bodové mutaci v jedné alele a současně ke ztrátě celého chromozomu 17 nebo deleci jeho části s genem p53 ve druhé alele genu (musí dojít k inaktivaci obou alel). Frekvence změn chromozomu 17 se u AML s bodovou mutací genu p53 pohybuje mezi 60-80 % (Fenaux et al., 1992; Christiansen et al., 2001; Nakano et al., 2000; Parry, 1997).

Onkogeny v AML

Onkogeny jsou geny vznikající poškozením přirozeného, správně fungujícího protoonkogenu následkem jeho abnormální aktivace (bodová mutace, delece, translokace, genová duplikace). Zvýšením exprese nebo hyperaktivitou proteinu (signální molekuly, povrchové receptory, regulační geny či geny buněčné diferenciace) dochází k nadměrnému buněčnému dělení a vzniku malignit.

mikroRNA-155

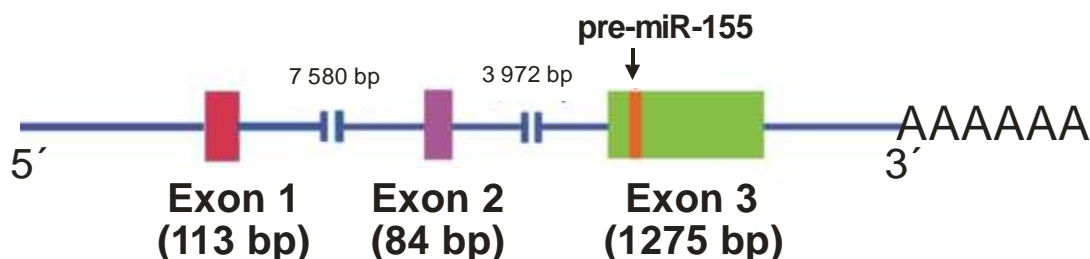
Úvod do světa mikroRNA

mikroRNA (miRNA) jsou malé nekódující jednovláknové molekuly RNA (21-25 nukleotidů dlouhé), evolučně konzervované u čtyř říší - Živočichové, Rostliny, Houby a Viry. miRNA databáze - "miRBase", obsahuje 1900 lidských mikroRNA a jejich počet stále stoupá (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011). mikroRNA jsou negativními post-transkripční regulátory genové exprese. K degradaci mRNA (rostliny) nebo inhibici translace/deadenylaci (živočichové) dochází vazbou miRNA na 3' nepřekládanou oblast (3' UTR) své cílové mRNA (Bartel et al., 2004; Lim et al., 2005). Přibližně u 30 % genů je dnes známa regulace prostřednictvím mikroRNA (Berezikov, 2011). Jedna miRNA může regulovat několik cílových mRNA, ale na druhé straně, několik miRNA může regulovat jednu cílovou mRNA (Lewis et al., 2003; Rajewsky, 2006). mikroRNA tak kontrolují jak fyziologické, tak patologické procesy v organismu, a proto jsou vhodnými kandidáty pro využití v prognostických a diagnostických testech při různých onemocněních, včetně leukémií a solidních nádorů.

mikroRNA kontrolují osud buňky prostřednictvím regulace buněčného cyklu, apoptózy, proliferace nebo diferenciace buněk.

mikroRNA-155

miR-155 je kódována protein-nekódujícím genem *BIC* (B cell Integration Cluster), označovaným také jako *Mir155 Host Gene* (*Mir155hg*). *BIC* gen se skládá ze tří exonů a pokrývá oblast 13kb na lidském chromozomu 21 (**obrázek 6**) (Tam et al., 1997). Sekundární strukturu *BIC* genu tvoří vlásenky s částečnou homologií bazí. Lidská *BIC* cDNA je v 83% totožná s myší *BIC* cDNA, navíc zralá lidská hsa-miR-155 se od myší mmu-miR-155 liší pouze v jednotlivých nukleotidech (Tam, 2001).



Obrázek 6: Struktura genu *Mir155hg/BIC*. Gen *Mir155hg* o celkové délce 13 024 bp je tvořen třemi exony. Exon 3 kóduje prekursor pre-miR-155, který je vyznačen oranžovým úsekem. (obrázek pozměněn z (Tam, 2001)).

Biologické funkce miR-155 a její role v leukemogenezi

Majoritní forma miR-155 5p zabírá svojí funkcí široký rozsah různých fyziologických a patologických procesu, včetně leukémie, nádorů nebo autoimunitních onemocnění (Elton et al., 2013; Faraoni et al., 2009; Leng et al., 2011).

Za normálních podmínek pomáhá miR-155 udržovat hematopoetické kmenové buňky (HSC) ve stádiu ranných kmenových progenitorových buněk prostřednictvím zablokování diferenciaci do myeloidních, erytroidních a lymfoidních linií a jejich dalšího zrání.

Expresi miR-155 byla rozsáhle studována u myeloidních malignit AML, CML nebo MDS (často se transformující do AML). Hladina miR-155 je výrazně zvýšená v AML blastech (Cammarata et al., 2010; Zhu et al., 2012), což přispívá k patologii AML. miR-155 je klíčový pozitivní regulátor myeloidní proliferace a jeho exprese musí být dynamicky regulována v normální myelopoéze (Ghani et al., 2011). Trvalé zvýšená exprese miR-155 v krvetvorných buňkách má za následek myeloproliferativní onemocnění s výraznou expanzí myeloidní progenitorové populace $\text{Mac1}^+\text{Gr1}^+$ a extramedulární hematopoézou ve slezině (O'Connell et al., 2008). Na začátku progenitorové diferenciaci a během myeloidního vývoje je role miR-155 úzce spojena s hladinou transkripčního faktoru PU.1, který se váže přímo na regulační oblasti *Mir155hg*, aby umožnil jeho expresi v ranné fázi liniové specifikace (Ghani et al., 2011). PU.1 indukuje expresi miR-155 i na počátku vývoje makrofágů, tato exprese však v průběhu další diferenciaci rychle klesá.

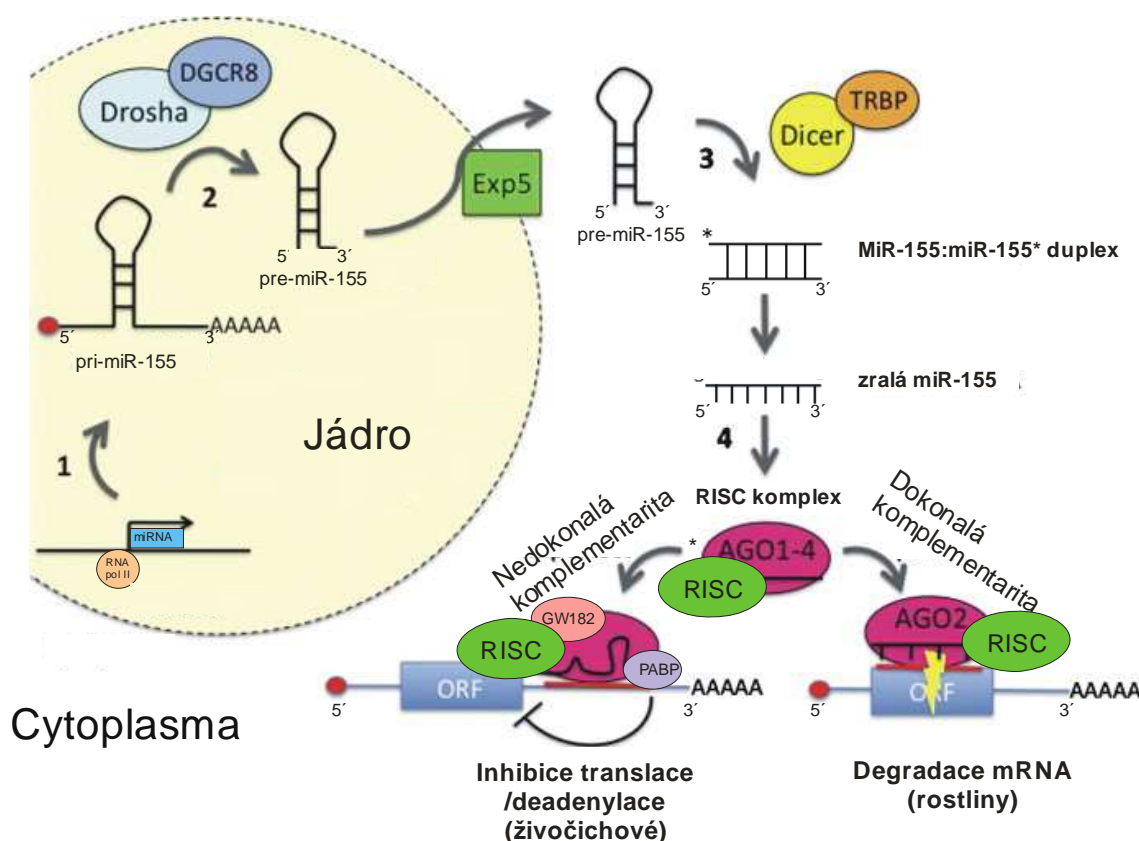
Expresie miR-155 byla kromě myeloidních malignit studována také v lymfoidních leukémiích například u B-CLL (Calin et al., 2005; Fulci et al., 2007; Li et al., 2013; Marton et al., 2008; Vargova et al., 2011) nebo ALL (Canale et al., 2011). Zvýšená expresie miR-155 byla prokázána u případů s agresivnější formou CLL (Rossi et al., 2010). miR-155 je důležitý při kontrole zrání B buněk (Calame, 2007; Fernando et al., 2012), protože aktivuje B buněčný receptor (BCR), který je důležitý pro produkci protilátek (Mraz & Kipps, 2013; van den Berg et al., 2003; Yin et al., 2008). B-CLL buňky s vysokou expresí miR-155 mají vyšší kapacitu pro BCR signalizaci (Chen et al., 2002). Deregulace miR-155 byla prokázána také u téměř všech B-buněčných lymfoproliferací (Hodgkinův a non-Hodgkinův lymfom, primární B lymfom, difuzní velkobuněčný B lymfom (DLBCL)) (Eis et al., 2005; Kluiver et al., 2005; Metzler et al., 2004; van den Berg et al., 2003). Například na myším modelu se zvýšenou hladinou miR-155 (myší model $E\mu$ -mmu-miR-155) bylo prokázáno, že miR-155 funguje jako aktivátor vývoje leukémie. Tento myší model vyvíjí již v prvním měsíci života pre-leukemickou fázi s expanzí polyklonálních B buněk a splenomegalií (Costinean et al., 2006), která v sedmém měsíci přechází v high-grade B-buněčný lymfom.

miR-155 se účastní vedle lymfoidních malignit také další patogeneze lymfoidních buněk: autoimunitních onemocnění, jako jsou revmatoidní artritida, roztroušená skleróza nebo systémový lupus erythematos (Leng et al., 2011). Expresie miR-155 hraje důležitou roli při vzniku protilátek v germinálním centru, čímž ovlivňuje imunitní odpověď organismu (Vigorito et al., 2007; Vigorito et al., 2013) a inhibuje procesy během zánětu (Ma et al., 2013), což koresponduje se zvýšenou expresí miR-155 při aktivaci T buněk (Haasch et al., 2002; Thai et al., 2007). U myšího modelu s nedostatečnou hladinou miR-155 dochází ke snížení germinálních center v B-buňkách a tím i ke snížení produkce protilátek s vysokou afinitou (Vigorito et al., 2007). Tato porucha tvorby protilátek je v důsledku blokování diferenciace B-buněk ve stádiu plasmablastu (stádium B-buněk mezi plazmou a zralými B-buňkami), a snížením produkce cytokinů (Rodriguez et al., 2007; Thai et al., 2007).

miR-155 hraje pravděpodobně také důležitou roli ve vývoji různých typů solidních nádorů (například nádory prsu, plic, tlustého střeva a děložního čípku) (Chang & Sharan, 2012; Kong et al., 2008; Volinia et al., 2006; M. Wang et al., 2008).

Biogeneze miR-155

Faktory podílející se na biogenezi mikroRNA a základní principy jejich fungování byly popsány v posledních letech (Tan Gana et al., 2012). Biogeneze miR-155 (ale i ostatních mikroRNA) (**Obrázek 7**), začíná v buněčném jádře vznikem primárního transkriptu - pri-miR-155 přepisem z genu *BIC* (*Mir155hg*) za účasti RNA polymerázy II (Lee et al., 2004). Tento primární transkript je následně štěpen enzymem Drosha (RNase III) a jeho kofaktorem DGCR8 (DiGeorge syndrome Critical Region gene 8) za vzniku prekurzoru - pre-miR-155. Štěpení pri-miR-155 na pre-miR-155 je důležitým krokem při definování sekvence zralé miR-155 (**Obrázek 7**) (Lund et al., 2004). Jaderný protein Exportin-5 transportuje pre-miR-155 z jádra do cytoplazmy (Yi et al., 2003). Enzyme Dicer spolu se svým ko-faktorem TRBP (TAR RNA binding protein) štěpí na 3' konci vlásenku pre-miR-155 za vzniku dočasného dvojvláknového duplexu miR-155:miR-155*, který se následně vlivem enzymu Dicer rozpadá za vzniku dvou zralých miR-155 (Eis et al., 2005; G Hutvágner et al., 2001). Majoritní zralá miR-155 5p (23nt) se začlení do aktivního RISC* komplexu (RNA Induced Silencing Complex) (Carthew & Sontheimer, 2009), zatímco minoritní vlákno miR-155 3p (miR-155*) (22nt) může kooperovat s majoritní miR-155 5p, ale může být i degradováno nebo hrát roli v patogenezi některých onemocnění (Zhou et al., 2010). Mechanismus miR-155 spočívá v navedení aktivního komplexu RISC* na 3' UTR konec cílové mRNA (Bartel, 2009). Komplex RISC je stabilizován čtyřmi proteiny argonaut (AGO1-4) (Breving & Esquela-Kerscher, 2010; Hutvágner & Zamore, 2002; Krol et al., 2010), které interagují s proteiny RISC* komplexu: GW182 (glycin-tryptofan protein) (Braun et al., 2011; Krol et al., 2010) a poly(A)vázajícím proteinem (PABP) a spolu s enzymem deadenylazou dochází k deadenylaci mRNA (Fabian et al., 2010). Účinnost degradace cílové mRNA vzrůstá, se zvyšujícím se stupněm komplementarity 3' UTR konce cílové mRNA s dostupnými vazebnými místy na mikroRNA (miR-155) (Treiber et al., 2012).



Obrázek 7: Biogeneze a procesování miR-155 Biogeneze miR-155 začíná v buněčném jádře a pokračuje v cytoplasmě. V prvním kroku vzniká primární transkript pri-miR-155, který je štěpen enzymem Drosha za vzniku prekursoru pre-miR-155. Exportin-5 exportuje pre-miR-155 z jádra do cytoplazmy. V cytoplasmě Dicer spolu s TRBP štěpí pre-miR-155 za vzniku duplexu miR-155:miR-155*. Zralá miR-155 se začlení do komplexu RISC a dochází ke stabilizaci pomocí proteinů AGO1-4. V tomto kroku je zralá miR-155 připravena k inhibici translace/deadenylaci (u živočichů) nebo k degradaci mRNA (u rostlin) (obrázek převzat a pozměněn z (Breving & Esquela-Kerscher, 2010)).

Regulace miR-155

Poruchy regulace exprese miR-155 hrají významnou roli v patogenezi nádorových, hematologických a autoimunitních onemocnění (Leng et al., 2011; Volinia et al., 2006). mikroRNA jsou často umístěny v genovém lokusu, který je amplifikovaný v nádorech (He et al., 2005) nebo v místech, které jsou často podrobeny genetickým mutacím: zlomy nebo delece (Zhang et al., 2006).

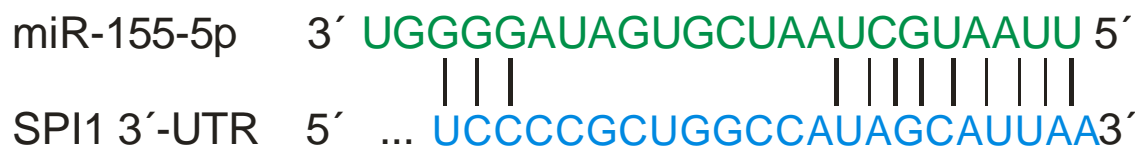
miR-155 je regulátor genové exprese, ale také podléhá preciznímu systému regulace. Zrání i každý krok biogeneze miR-155 jsou přísně regulovány. K regulaci na

úrovni pri-miR-155 dochází interakcí s proteiny/kofaktory účastnících se celé řady drah (p53, p68, SMAD4, TNFa, TLR, TGF- β , AP-1), výsledkem je rozdílná exprese miR-155 (Kong et al., 2008; O'Connell et al., 2007; Suzuki et al., 2009; Tili et al., 2007; van den Berg et al., 2003). Mutace v pre-miR-155 a/nebo zralých miR-155 sekvencích ovlivňují další procesování miR-155, stabilitu a výběr cílových mRNA. Tyto mutace pocházejí ze změn v kódujících sekvencích DNA a z post-transkripčních úprav RNA (Iwai & Naraba, 2005; Sun et al., 2009). K regulaci miR-155 exprese dochází i na úrovni promotoru. Například přímá vazba transkripčního faktoru (FOXP3, STAT3) (Li et al., 2013; Zuo et al., 2007) pozitivně reguluje transkripci miR-155, zatímco epigenetické změny chromatinu (např. deacetylase histonů) (Chang & Sharan, 2012) regulují expresi miR155 negativně. Z výše uvedeného vyplývá, že hladina miR-155 je na transkripční úrovni regulována různými mechanizmy.

miRNA-155 a jeho přímý cíl PU.1

Onkogenní mechanismy, například interference mikroRNA-155 s mRNA *PU.1*, vedou k poklesu proteinové syntézy PU.1 a následně k bloku terminální fáze vývoje myelodininých buněk (O'Connell et al., 2008).

Tumor supresor PU.1 je jedním z cílových genů miR-155, na základě komplementární interakce s mRNA pro PU.1. miR-155 se váže na 3'konec nepřekládaného úseku mRNA transkriptu PU.1 a tím k inhibici translace PU.1 (**Obrázek 8**) (Vargova et al., 2011; Vigorito et al., 2007). Zvýšení hladiny miR-155 vede k poklesu hladiny PU.1. Tento mechanismus byl potvrzen například v myším modelu s delecí miR-155, když došlo ke zvýšení hladiny jak exprese mRNA pro PU.1, tak i proteinu PU.1 (Vigorito et al., 2007).



Obrázek 8: Komplementární párování bází mezi hsa-miR-155-5p a mRNA pro *SPI1* (*PU.1*). Vazebné místo pro majoritní formu miR-155-5p se nachází 46 až 53 párů bází downstream od sekvence stop kodonu na mRNA pro PU.1. Vazebná sekvence je reprezentována 9 nukleotidy (obrázek upraven z (Friedman et al., 2009)).

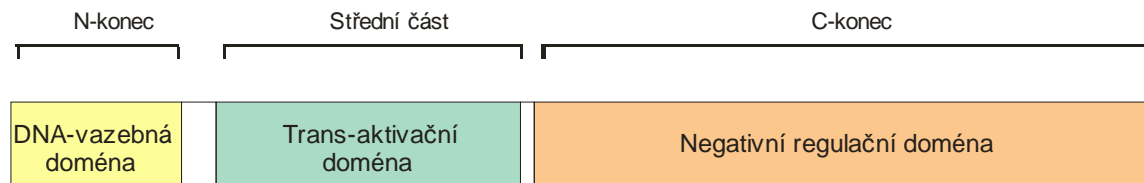
E-box protein Myb

E-box (enhancer box) proteiny jsou DNA vazebné proteiny hrající důležitou roli v regulaci transkripční aktivity a jsou potřebné pro normální krvetvorbu.

Protoonkogen *Myb* je buněčný homolog genu *v-Myb* (virový onkogen v-myeloblastózy). Jeho produkt – protein Myb je členem E-box rodiny onkogenních transkripčních faktorů zahrnující také Mybl1 (tzv. A-Myb), Mybl2 (tzv. B-Myb), Myc, N-Myc a virové geny *v-Myb*. Každý člen rodiny má rozdílnou funkci a je exprimován v rozdílných tkání a buňkách (Oh & Reddy, 1999). Myb je součástí genomu dvou ptačích virů myeloblastózy, které indukují akutní leukémii (Roussel et al, 1979).

Struktura Myb

Proteiny E-box rodiny se skládají ze dvou α -šroubovic oddělených relativně krátkou sekvencí aminokyselin tvořící jeden nebo více β -listů, které dohromady vytvářejí konfiguraci typu šroubovice-otáčka-šroubovice (Nomura et al., 1988), která jim umožňuje vázat se ve formě dimerů (Ellenberger et al., 1994). Myb je DNA-vázající transkripční faktor, který rozpoznává specifickou sekvenci PyAACG/TG (Biedenkapp, 1988; Boyle et al., 1983). Myb obsahuje 3 různé funkční domény (**Obrázek 9**). Na N-koncovém úseku Myb obsahuje tři vysoce konzervované repetice aminokyselin, které tvoří specifitu DNA-vazebné domény. Pomocí této domény Myb rovněž interaguje s řadou ko-aktivátorů/ko-represorů, které ovlivňují jeho aktivitu (Alm-Kristiansen et al., 2008; Saether et al., 2007). Ve střední části obsahuje Myb trans-aktivační doménu a na C-koncovém úseku se nachází negativní regulační doména důležitá pro regulaci transkripční aktivity Myb (Aziz et al., 1995; D R Pattabiraman & Gonda, 2013).



Obrázek 9: Struktura proteinu Myb. Na N-koncovém úseku Myb obsahuje DNA-vazebnou doménu, ve střední části transaktivační doménu a na C-konci obsahuje negativní regulační doménu (obrázek pozměněn z (D R Pattabiraman & Gonda, 2013)).

Biologická funkce Myb a jeho role v leukemogenezi

Myb je důležitý transkripční faktor, který ovlivňuje normální hematopoézu skrze pozitivní či negativní regulací více než 80 cílových genů. Deregulace jeho exprese hraje roli v leukemogenezi (Emambokus et al., 2003; Lei et al., 2004; Ramsay & Gonda, 2008).

Mezi klíčové biologické funkce Myb patří zachování schopnosti diferenciace, sebeobnovy, regulace buněčného cyklu a proliferace v progenitorových buňkách.

Význam Myb v krvetvorbě a jeho vliv na leukemogenezi byl prokázán pomocí myších modelů. U homozygotních myší s delecí Myb byl pozorován abnormální fenotyp vyznačující se 10-krát sníženým hematokritem, nízkým počtem multipotentních krvetvorných progenitorových buněk, nízkým počtem myeloidních buněk a erytrocytů. Myši umírají v den E15 na anémii a selhání definitivní krvetvorby (Mucenski et al., 1991). Myší model s delecí Myb potvrzuje také nepostradatelnost Myb pro vývoj zralých B lymfocytů. Ztráta Myb způsobuje částečnou blokaci vývoje B buněk, a to na přechodu mezi pro-B a pre-B lymfocyty (Greig et al., 2010; Thomas et al., 2005). V myším modelu se zvýšenou hladinu Myb pomocí retrovirální inzerce dochází k indukci AML M5 podle FAB klasifikace (Wolff et al., 1996). Data z mikroarrays ukázala, že Myb je potřebný pro indukci exprese několika lymfoidních genů například *Sfp11* (PU.1) v multipotentních progenitorových buňkách (Greig et al., 2010).

Další studie ukazují, že MYB je cílem celé řady somatických mutací a translokací v lidských nádorových onemocnění, a proto je důležitým lidským onkogenem (Clappier et al., 2007; Persson et al., 2009). Deregulace hladiny exprese MYB je spojena s leukemogenezí. Úroveň exprese MYB může být regulována působením samotného MYB, spoluprací s řadou transkripčních faktorů, koaktivátory, regulačními proteiny, strukturálními změnami a/nebo genomickým přeskupením (Murati et al., 2009; Tomita et al., 1998). Zvýšená hladina exprese MYB, zapříčiněná genomickými změnami (translokací, zvojením genu *MYB*) (Clappier et al., 2007; Lahortiga et al., 2007; O'Neil & Look, 2007) nebo alternativním sestřihem (malé změny ve struktuře při zablokování DNA-vázající domény) (Tomita et al., 1998), spouští onkogenní aktivitu MYB, čímž dochází k zablokování diferenciace myeloidních progenitorů a vzniku leukemie (AML, T-ALL, B-ALL) s horší prognózou (O'Rourke & Ness, 2008; Patel et al., 1993; Pattabiraman et al., 2009; Preisler et al., 1989). Naopak

snížení hladiny exprese MYB má anti-proliferační účinky (Luger, 2002; Somervaille et al., 2009) a vede k diferenciaci krvetvorných buněk a tím k zabránění iniciace leukemogeneze (Hess et al., 2006; Lahortiga et al., 2007).

HYPOTÉZA A SPECIFICKÉ CÍLE

Na základě souhrnu výše uvedených zjištění byla vytvořena pracovní hypotéza mé výzkumné práce zpracované v této dizertační práci:

1. Snížená hladina transkripčního faktoru PU.1 v kmenových buňkách rozhoduje nejen o vzniku AML ale i o její agresivitě.
2. Snížení hladiny PU.1 je zapříčiněno nadměrnou přítomností mikroRNA-155 a její exprese je klíčovým onkogenním mediátorem AML.
3. Role ostatních onkogenů (např. MYB a MYC) a tumor supresoru p53 pravděpodobně ovlivňuje deregulaci miR-155 a tím inhibici jeho cílového genu PU.1.

Stanovila jsem si konkrétní cíle, jejichž naplnění je obsahem této dizertační práce:

1. Vytvořit nový myší model nesoucí jak delecii tumor supresoru p53, tak delecii regulační oblasti URE genu *PU.1*.
2. Porovnat modely s jednou nebo dvojitou mutací především z hlediska vývoje AML: úbytku hmotnosti myší, velikosti hematopoetických orgánů, krevního obrazu, povrchových molekul blastů a celkového přežití.
3. Zjistit hladinu PU.1 a miR-155 v kmenových buňkách, progenitorech a c-Kit⁺ blastech v myších modelech s jednou nebo dvojitou mutací a jejich případný vztah k agresivitě onemocnění AML.
4. Zjistit hladinu onkogenů Myb a Myc v c-Kit⁺ blastech ve všech našich myších modelech.

5. Testovat funkční propojení mezi případnou změnou v regulaci onkogenů Myb a miR-155 a tumor supresory PU.1 a p53.
6. Testovat zda manipulace těchto faktorů (bud' inhibice onkogenů (Myb a miR-155), nebo znovuoobnovení PU.1) ovlivňuje obnovu základních vlastností poškozené krvetvorby a diferenciaci leukemických blastů *in vitro*.
7. Zjistit zda případné propojení mezi onkogeny Myb a miR-155 a tumor supresory PU.1 a p53 existuje i v lidské AML.

MATERIÁL

Přístroje a pomůcky

Přístroj

7900HT Fast Real-time PCR System
 Amaxa nukleofektor
 Analytické váhy ALJ 220-4
 AutoMACS Pro Separator
 BD FACS Aria IIu
 BD FACS CantoII
 Bioanalyzer 2100
 Centrifuga 5804 R
 Centrifuga 5417R
 Fotoaparát Canon G12
 Forma Direct Heat CO2 Incubators
 Genetic Analyzer 3500
 Laminární box Bio-II-A
 Magnetický míchač Heating Magnetic Stirrer
 Mastercycler Gradient
 Měřič pH/mV/Temp Meter PL-600
 Mikroskop Eclipse TS100
 Mikroskop T-DH
 Microtom
 Parní sterilizátor
 Pipetboy accu-jet
 PowerPac Basic
 ProVis XC70 mikroskop
 Separační kolony
 Sonikátor Digital sonifier M500
 Spectrofotometr ND-1000
 Telstar BioIIA

Výrobce

Life Technologies
 Lonza
 KERN
 Milteny Biotec
 BD Biosciences
 BD Biosciences
 Agilent Technol.
 Eppendorf
 Eppendorf
 Canon
 Thermo Electron corporation
 Life Technologies
 TELSTAR
 Velp Scientifica
 Eppendorf
 EZDO
 Nikon
 Nikon
 Leova
 Sterilab
 Brand
 BIO-RAD
 Olympus
 Miltenyi Biotec
 Branson
 NanoDrop Technol.
 KRD

Termoblok Thermomixer comfort	Eppendorf
Transformátor stejnosměrného proudu PowerPac Basic	Bio-Rad
UV lampa	Sigma
Vortex MS1 Minishaker	IKA

Speciální počítačové programy

Program	Výrobce
FACSDiva software v.6.1	BD Biosciences
ProbeFinder Version 2.45	Roche
Vektor NTI	Life Technologies
TIGR MultiExperimentViewer 4.0.01	TM4 Microarray Software

Biologický materiál

Myší modely

PU.1^{ure/ure} *Mus musculus*, kmen 129Sv, Sfp1tm1.3Dgt/J

Transgenní myš PU.1^{ure/ure} byla vytvořena na běžném pozadí 129Sv *Mus musculus* ve spolupracující laboratoři. (Rosenbauer et al., 2004). Transgenní myš nese delecii v rozsahu 3,4 kb v oblasti URE lokalizovaného 14 kb nad místem transkripčního počátku endogenního genu *PU.1*. U homozygotních myší pro delecii URE ve věku 3-8 měsíců propuká onemocnění AML. Homozygoti PU.1^{ure/ure} mají expresi PU.1 sniženou o 80%. Heterozygotní mutantní myši PU.1^{ure/+} jsou zcela normální na vzhled a chování. Myší model PU.1^{ure/ure} byl poskytnut Dr. Ulrichem Steidlem a Dr. Danielelem G. Tenenem z Harvard Stem Cell Institute, Boston, MA, USA.

p53^{-/-} *Mus musculus*, kmen C57BL/6J, Trp53^{tm1Tyj}

Transgenní myš p53^{-/-} byla vytvořena na běžném pozadí C57BL/6J *Mus musculus* (Jacks et al., 1994). Transgenní myš nese inzerci neomycinové kazety, která nahrazuje 40% kódující sekvence genu *Trp53* sahající od exonu 2 po exon 6. Homozygotní myši p53^{-/-} nemají zprvu viditelný fenotyp, ale ve věku 3-6 měsíců se u nich objevují solidní tumory. U heterozygotních myší p53^{+/-} se tumory objevují až ve

věku 10 - 18 měsíců. Myší model p53^{-/-} byl zakoupen z Jacksonovy laboratoře (The Jackson Laboratory) Bar Harbor, Maine, USA.

Primární vzorky pacientů s AML/MDS a zdravých kontrol

Od roku 2007 se na našem pracovišti zásluhou MUDr. Anny Jonášové z I. interní kliniky – kliniky hematologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze shromáždily vzorky periferní krve od 36 pacientů s AML a 14 zdravých kontrol. Mononukleární buňky z periferní krve (PBMCs) byly ze vzorků separovány pomocí denzitní gradientové centrifugace (Ficoll-Paque). Tato práce proběhla s podporou přednosty, jmenovitě Prof. MUDr. Marka Trněného, CSc. Vzorky byly od pacientů získány na základě informovaného souhlasu (v souladu s požadavky Helsinské deklarace). Soubor pacientů se skládá z 19 mužů a 17 žen. Věkový medián pacientů je 71 let (v rozmezí od 58 do 83 let). Diagnostické a prognostické zhodnocení bylo provedeno v souladu s postupem WHO (<http://www.nccn.com>): 32 pacientů AML (24 pacientů - primární AML, 8 pacientů - sekundární MDS/AML) a 4 pacienti MDS (RAEB). Všechny patientské vzorky byly odebrány v době diagnózy onemocnění. Klinické údaje a parametry pacientů a kontrol jsou popsány níže (**Tabulka 3 a Tabulka 4**).

	Označení	sex	Datum odběru vzorku	Věk	Izolované buňky
CTRL	C123	M	2.5.13	36	CD19,CD3-depleted PBMCs, CD34+
CTRL	C124	M	2.5.13	43	CD19,CD3-depleted PBMCs
CTRL	C125	F	3.5.13	30	CD19,CD3-depleted PBMCs
CTRL	C126	F	3.5.13	49	CD19,CD3-depleted PBMCs, CD34+
CTRL	C127	M	3.5.13	26	CD19,CD3-depleted PBMCs, CD34+
CTRL	C 07	F	26.4.07	35	PBMCs
CTRL	C 08	F	3.5.07	54	PBMCs
CTRL	C 09	M	3.5.07	44	PBMCs
CTRL	C 10	F	10.5.07	29	PBMCs
CTRL	C 11	F	10.5.07	28	PBMCs
CTRL	C 12	M	5.9.07	36	PBMCs
CTRL	C 13	F	10.9.07	28	PBMCs

Tabulka 3. Klinické údaje zdravých kontrol použitých ve Výsledkovém obrázku 25 a 27. V tabulce jsou zleva doprava uvedeny následující parametry: kódové označení vzorku, pohlaví, datum odběru vzorku, věk, buňky izolované ze vzorku.

	Označení	sex	Datum dg	OS (Měsíce)	Věk	Dg	FAB	Izolované buňky	%blastů PB- FACS	% blasts PB- nátěr	Karyotyp	FISH	zemřel1/ žije0	Poslední kontrola	DOB
PU.1 LOW	P 19	F	8.4.07	2	72	AML	M0/1	PBMC	96	91	ND	ND	1	8.6.07	1.1.35
PU.1 LOW	P 26	M	10.6.07	42	58	AML	M1	PBMC	42	58	Normalní	Normalní	1	13.12.10	27.1.49
PU.1 LOW	P 38	M	5.6.07	6	76	AML	M1	PBMC	64	21	ND	ND	1	11.12.07	19.6.31
PU.1 LOW	P 46	M	1.2.08	3	66	AML	M1	PBMC	65	80	Komplexní karyotyp	del.p53,del.5q31,0 MLL	1	23.4.08	30.3.42
PU.1 LOW	P 50	F	19.2.08	4	64	AML	M1	PBMC	33	40	Komplexní karyotyp	del.p53,del.5q31,del.7q31, 0 MLL	1	18.6.08	14.1.44
PU.1 LOW	P 112	F	8.9.08	7	73	AML	M1	PBMC	92	94	delece Y in 76,4%	ND (5 mitos)	1	23.3.09	1.1.36
PU.1 LOW	P 114	F	8.8.08	16	60	AML	M4	PBMC	83	90	Normalní	0 CBFβ	1	9.12.09	22.8.48
PU.1 LOW	P 118	F	1.2.08	9	72	AML	M0	PBMC	18	24	Normalní	0 5q31	1	12.11.08	3.8.35
PU.1 LOW	P 121	M	10.9.08	2	82	AML	NA	PBMC	23	20	Normalní	NA (0 mitos)	1	9.11.08	8.8.26
PU.1 LOW	P 125	M	1.10.08	6	68	AML	M2	PBMC	45	50	Komplexní karyotyp	del.7q31,0 MLL, 0 p53	1	7.4.09	16.9.40
PU.1 LOW	P 129	F	6.11.08	1	71	AML	M2	PBMC	ND	63	ND	ND	1	1.12.08	23.11.37
PU.1 LOW	P 165	M	1.10.08	6	68	AML	M2	PBMC	80	80	Komplexní karyotyp	monosomie 7 ve všech, del p53 (17p13.1) v 3	1	7.4.09	16.9.40
PU.1 LOW	P213	F	17.12.09	5	64	AML	M4	PBMC	53	9	5q-	delece 5q31 v 64%, monosomie 5 v 30%	1	24.5.10	8.2.46
PU.1 LOW	P238	F	1.2.10	4	74	AML	M1	PBMC	87	89	Normalní	NA (0 mitos)	1	22.5.10	21.7.36
PU.1 LOW	P 663	M	1.12.11	4	80	AML	M0	PBMC	68	68	Komplexní karyotyp	NA	1	14.4.12	3.11.31
PU.1 LOW	P 664	F	27.12.07	52	72	AML	M2	PBMC	78	78	10 : t(4;8)(q?;q21.1)	10x t(4;8)(q?;q21.1)	1	20.4.12	28.5.36
PU.1 LOW	P 692	M	1.10.11	8	67	AML	M1	PBMC	24,4	23,2	Delece 7q31	delece 7q31	1	4.6.12	22.6.44
PU.1 LOW	P 172	M	1.1.09	7	83	AML/MDS	NA	PBMC	46	24	Komplexní karyotyp	Komplexní karyotyp	1	5.8.09	3.3.26
PU.1 LOW	P 146	M	1.10.08	18	61	MDS	RAEB	PBMC	ND	10	Komplexní karyotyp	Komplexní karyotyp	1	18.3.10	17.10.47
PU.1 LOW	P 188	F	1.12.08	9	72	MDS	RAEB	PBMC	ND	39	Normalní	NA (0 mitos)	1	5.9.09	1.2.37
PU.1 LOW	P 374	M	8.11.10	16	69	MDS	RAEB	PBMC	14,6	8,4	46XY	20 mitos, 46 XY	1	19.3.12	14.10.41
PU.1 LOW	P 225	M	26.11.09	11	77	MDS/AML	M0	PBMC	17	11	Normalní	46 XY	1	23.10.10	30.1.33
PU.1 LOW	P 124	F	29.9.08	8	72	MF/AML	M2	PBMC	42	38	NA	del.20q12,der(15)	1	18.5.09	8.6.36
PU.1 LOW	P 44	M	1.10.07	4	70	MPD/AML	M5	PBMC	61	82	Komplexní karyotyp	Komplexní karyotyp	1	9.2.08	17.10.37
PU.1 NORM	P 31	F	1.2.07	19	82	AML	M2/4	PBMC	ND	24	Normalní	NA (0 mitos)	1	29.8.08	1.7.25
PU.1 NORM	P 113	M	1.4.08	7	66	AML	M4/5	PBMC	25	44	trisomie 8	trisomie 8, 5q31	1	17.10.08	2.7.42
PU.1 NORM	P 115	F	9.8.08	56	60	AML	M1	PBMC	90	19	inv(16)	inv(16) v 39%	0	9.4.13	25.11.48
PU.1 NORM	P 187	M	1.10.08	13	66	AML	M4	PBMC	9	5	trisomie 8	trisomie 8 v 16%	1	27.10.09	20.8.42
PU.1 NORM	P444	F	9.3.10	26	76	AML	AML/T-ALL	PBMC	18	45	5q-	delece 5q31	1	19.5.12	1.1.34
PU.1 NORM	P 87	F	1.2.08	12	81	AML	M2	PBMC	ND	3	Normalní	NA (0 mitos)	1	2.2.09	29.1.27
PU.1 NORM	P 140	M	1.10.08	13	66	AML-CR	M4	PBMC	ND	0	trisomie 8	trisomie 8 v 16%	1	27.10.09	20.8.42
PU.1 NORM	P 84	M	1.2.07	19	74	MDS	RAEB	PBMC	10	10	Komplexní karyotyp	NA	1	26.8.08	29.8.32
PU.1 NORM	P 16	M	1.4.05	30	75	MDS/AML	M0	PBMC	ND	ND	ND	ND	1	23.9.07	29.10.29
PU.1 NORM	P 122	F	1.2.08	9	70	MDS/AML	NA	PBMC	27	28	NA	22 mitos, 46 XX	1	12.11.08	13.4.38
PU.1 NORM	P 415	F	5.10.10	11	72	MDS/AML	M1	PBMC	41	47	Normalní	NA (0 mitos)	1	27.8.11	21.4.38
PU.1 NORM	P 587	M	7.1.10	26	68	MDS/AML	M0	PBMC	66,8	77	NA	35x XYYY, 93x +marker	1	5.3.12	3.10.41

Tabulka 4. Klinické údaje pacientů s AML a MDS/AML použitých ve Výsledkovém obrázku 24 - 27. V tabulce jsou zleva doprava uvedeny následující parametry: kódové označení vzorku, pohlaví pacienta, datum diagnózy, doba celkového přežití (OS) (v měsících), věk pacienta, diagnóza (dg), FAB klasifikace AML onemocnění, buňky izolované ze vzorku, % blastů v periferní krvi (FACS a krevní nátěr), cytogenetika, FISH, status přežití pacienta (1 – zemřel, 0 – žije), poslední kontrola, datum narození (DOB), NA – odpověď není dostupná, ND – nebylo změřeno.

Buněčné linie

NB4 (#ACC 207)

Tato buněčná linie, byla odvozena v roce 1989 z kostní dřeně 23-leté ženy s akutní promyelocytární leukémií (APL = AML FAB M3) v druhém relapsu; buňky nesou translokaci t(15;17) (Drexler 1995).

Morfologicky jsou buňky kulaté a polymorfní; rostoucí v suspenzi. NB4 buňky byly kultivovány v médiu RPMI-1640 s 10% FBS a 1% P/S při teplotě 37°C v 5% atmosféře CO₂. Doba zdvojení je 35 až 45 hodin. Buňky byly zamrazeny v médiu obsahujícím 70% RPMI-1640, 20% FBS a 10% DMSO.

Kvasinky

Saccharomyces cerevisiae (pivní kvasinka)

Tyto buňky jsou oválné až kulovité, velké 5-10 mikrometrů. Velmi snadno se kultivuje, rozmnožuje se speciálním typem dělení - tzv. pučením. *Saccharomyces cerevisiae* byla použita při metodě ChIP (mapování histonových modifikací ve vzdálených regulačních oblastech myši mikroRNA miR-155) pro navýšení koncentrace buněčného lyzátu potřebného pro tuto metodu. Navržené primery neumožňují namnožení úseků DNA získaných ze *Saccharomyces cerevisiae*.

Primery a TaqMan[®] sondy

Primery byly navrženy s pomocí programu ProbeFinder Version 2.45. a syntetizovány firmou KRD (Life Technologies), Praha. V každé dvojici primerů je

jeden označen jako F (forwad, vpřed) a druhý jako R (reverse, zpět). Primery jsou označeny písmenem m (murine; myší) nebo h (human; lidský).

Primery pro stanovení genotypu myších modelů $p53^{-/-}$ a $PU.1^{ure/ure}$ pomocí PCR

Primery označené TP53 byly použity pro detekci myší s delecí genu *Trp53* sáhající od exonu 2 po exon 6. Primery, jejichž označení začíná PU.1, byly použity pro detekci myší s delecí URE oblasti. Písmena W a M rozlišují, zda se jedná o wild-type (W), nebo mutantní (M) alelu.

Označení primeru	Sekvence primeru
TP53W-F	ATCCCGAGTATCTGGAAGACAGGC
TP53M-F	TTTGAATGGAAGGATTGGAGCTACGG
TP53WM-R	GAAACAGGCTAACCTAACCTACCACGC
PU.1W-F	TGTTTCGAGAACCGAAGGGAATGAC
PU.1M-F	TGTCACGTCCTGCACGACGCGAGCTGC
PU.1WM-R	AGCTGGACCGGAGGATCTGCGGAAC

Primery pro stanovení exprese mikroRNA mmu-miR-155 a hsa-miR-155

Označení primeru	Sekvence primeru	AB Assay ID
mmu-miR-155	UUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGG	1806
snoRNA202	GCUGUACUGACUUGAUGAAAGUACUUUUGAACCCUUUCCAUCUGAUG	1232
hsa-miR-155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	2623
RNU44	CCUGGAUGAUGAUAGCAAAUGCUGACUGAACAUGAAGGUCUAAUAGCUCUACUGACU	1094

Primery referenčních (host-keeping) genů pro qPCR

Označení primeru	Sekvence primeru	Roche sonda
mHprt(mRNA) F	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	#95
mHprt(mRNA) R	CCTGGTTCATCATCGCTAATC	#95
m18S (rRNA) F	GCAATTATTCCCCATGAACG	#48
m18S (rRNA) R	GGGACTTAATCAACGCAAGC	#48
hGAPDH (mRNA) F	AGCCACATCGCTCAGACAC	#60
hGAPDH (mRNA) R	GCCCAATACGACCAAATCC	#60

Primery pro stanovení exprese mRNA vybraných genů metodou qPCR

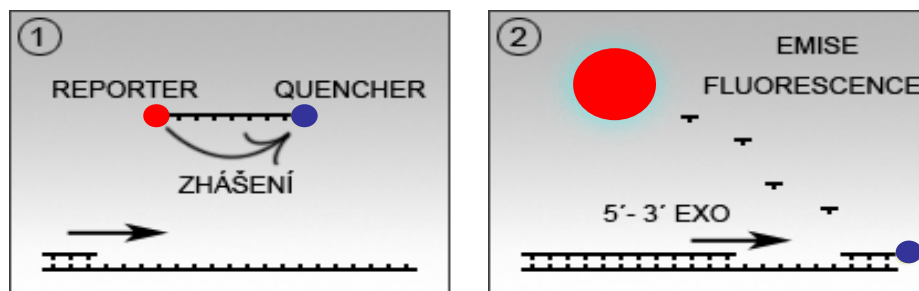
Označení primeru	Sekvence primeru	Roche sonda
mSpi1 (mRNA) F	GGGATCTGACCAACCTGGA	#42
mSpi1 (mRNA) R	AACCAAGTCATCCGATGGAG	#42
mMyb (mRNA) F	AGCTGGAGTTGCTCCTGATGTCAAC	#40
mMyb (mRNA) R	GCTGCAAGTGTGGTTCTGTGTTGG	#40
mMyc (mRNA) F	CCTAGTGCTGCATGAGGAGA	#77
mMyc (mRNA) R	CCTCATCTTCTTGCTCTTCTTCAG	#77
mFos (mRNA) F	GGGACAGCCTTTCCTACTACC	#67
mFos (mRNA) R	GATCTGCGCAAAAGTCCTGT	#67
mCsf1r (mRNA) F	CGAGGGAGACTCCAGCTACA	#80
mCsf1r (mRNA) R	GACTGGAGAAGCCACTGTCC	#80
mp21(mRNA) F	TTGCCAGCAGAATAAAAAGGTG	#9
mp21(mRNA) R	TTTGCTCCTGTGCGGAAC	#9
mp53(mRNA) F	CCTGGCTGTAGGTAGCGACT	#3
mp53(mRNA) R	ACTCCTCCATGGCAGTCATC	#3
mCbfb(mRNA) F	GCCTGGAGTTTGATGAGGAG	#3
mCbfb(mRNA) R	TCAAAGGCCTGTTGTGCTAA	#3
mItgam (mRNA) F	CAATAGCCAGCCTCAGTGC	#76
mItgam (mRNA) R	GAGCCCAGGGGAGAAGTG	#76
mCebpa (mRNA) F	AAACAACGCAACGTGGAGA	#67
mCebpa (mRNA) R	GCGGTCATTGTCACTGGTC	#67
mMpo (mRNA) F	GGAAGGAGACCTAGAGGTTGG	#7
mMpo (mRNA) R	TAGCACAGGAAGGCCAATG	#7
mEgr2 (mRNA) F	CTACCCGGTGGAAGACCTC	#60
mEgr2 (mRNA) R	AATGTTGATCATGCCATCTCC	#60
mCD14 (mRNA) F	AAAGAAACTGAAGCCTTTCTCG	#26
mCD14 (mRNA) R	AGCAACAAGCCAAGCACAC	#26
hSPI1 (mRNA) F	CCACTGGAGGTGTCTGACG	#27
hSPI1 (mRNA) R	CTGGTACAGGCGGATCTTCT	#27
hMYB (mRNA) F	TGCTCCTAATGTCAACCGAGA	#56
hMYB (mRNA) R	AGCTGCATGTGTGGTTCTGT	#56

hMYC (mRNA) F	CACCAGCAGCGACTCTGA	#34
hMYC (mRNA) R	GATCCAGACTCTGACCTTTTGC	#34
hp21 (mRNA) F	CCGAAGTCAGTTCCTTGTGG	#82
hp21 (mRNA) R	CATGGGTTCTGACGGACAT	#82
hp53 (mRNA) F	AGGCCTTGGAAGTCAAGGAT	#12
hp53 (mRNA) R	CCCTTTTGGACTTCAGGTG	#12
hFOS (mRNA) F	CTACCACTCACCCGCAGACT	#67
hFOS (mRNA) R	AGGTCCGTGCAGAAGTCCT	#67
hCSF1R (mRNA) F	TCTGGTCCTATGGCATCCTC	#14
hCSF1R (mRNA) R	TGCCAGGGTAGGGATTCA	#14
hCBFB (mRNA) F	TTCACAGCTGCTGGCAGTAA	#9
hCBFB (mRNA) R	GCTGTGCTATTAATTAACGAAGTTTG	#9
hITGAM (mRNA) F	ACCCCTGGTTCACCTCCT	#36
hITGAM (mRNA) R	CATGACATAAGGTCAAGGCTGT	#36
hCEBPA (mRNA) F	GGAGCTGAGATCCCGACA	#28
hCEBPA (mRNA) R	TTCTAAGGACAGGCGTGGAG	#28
hMPO (mRNA) F	CGTCAACTGCGAGACCAG	#38
hMPO (mRNA) R	GTCATTGGGCGGGATCTT	#38
hEGR2 (mRNA) F	AACGGAGTGGCCGGAGATGGCATG	#3
hEGR2 (mRNA) R	TGCAGAGACGGGAGCAAAGCTGCTG	#3
hCD14 (mRNA) F	GTTCGGAAGACTTATCGACCAT	#74
hCD14 (mRNA) R	ACAAGGTTCTGGCGTGGT	#74

Duálně značené sondy Roche (TaqMan) použité pro kvantifikaci exprese mRNA vybraných genů

Princip duálně značených sond (*nazývaných též hydrolyzační sondy nebo TaqMan[®] sondy*) využívá 5'-3' exonukleázové aktivity *Taq* DNA polymerázy ke štěpení neprodlužovatelné sondy značené na koncích párem fluoroforů, z nichž jeden je fluoreskující (*reporter*) navázaný na 5'-konci a druhý nefluoreskující - tzv. quencher (*zhášec*) navázaný na 3'-konci (**Obrázek 10**). Sonda je navržena tak, aby její sekvence byla komplementární k určité cílové sekvenci uvnitř amplifikovaného regionu. Pokud je sonda v intaktním stavu, jsou oba fluorofory drženy v prostorové blízkosti a quencher

pohlcuje (zháší) fluorescenční záření emitované reporterem. Pokud sonda zhybridizuje s cílovou sekvencí, je během elongační fáze PCR štěpena prostřednictvím 5'-3' exonukleázové aktivity *Taq* DNA polymerázy, čímž dochází k prostorovému oddělení fluoroforů a zvýšení fluorescenční aktivity reporteru.



Obrázek 10. Schéma principu duálně značené sondy. Schéma 1 znázorňuje sondu v intaktním stavu, schéma 2 znázorňuje sondu zhybridizovanou s cílovou sekvencí. (Obrázek z webových stránek: <http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-o-dualne-znacenych-sondach/> byl pozměněn).

Předností sond systému TaqMan je jejich vysoká specifita. Fluorescenční signál vzniká pouze v případě hybridizace sondy s její specifickou cílovou sekvencí, takže se eliminuje možnost zachycení signálu z nespecificky namnožených produktů PCR.

Označení sondy	Sekvence sondy	Kat. Číslo
#3	CCCAGCAG	(cat. no. 04685008001)
#7	CTTCTCCC	(cat. no. 04685059001)
#9	TGGTGATG	(cat. no. 04685075001)
#12	CTCCTTCC	(cat. no. 04685113001)
#14	CTGGGAGA	(cat. no. 4685130001)
#26	CAGCCCAG	(cat. no. 04687574001)
#27	CAGGCAGC	(cat. no. 04687582001)
#28	CCAGCCGC	(cat. no. 04687604001)
#34	CTGCCTCT	(cat. no. 04687671001)
#36	CTGGCTCC	(cat. no. 4687949001)
#38	CTGCTTCC	(cat. no. 04687965001)
#40	CAGCAGGC	(cat. no. 04687990001)
#42	CCAGCAGC	(cat. no. 04688015001)

#48	TTCCCAGT	(cat. no. 04688082001)
#56	TGCTGTCC	(cat. no. 04688538001)
#60	CTTCCCCA	(cat. no. 04688589001)
#67	TGCTGGAG	(cat. no. 04688660001)
#74	CTGCTGCC	(cat. no. 4688970001)
#76	TGGCTGTG	(cat. no. 04688996001)
#77	CCACCACC	(cat. no. 04689003001)
#80	CCTGGAGA	(cat. no. 04689038001)
#82	CAGAGGAG	(cat. no. 04689054001)
#95	CTGGGACT	(cat. no. 04692128001)

Primery použité v metodě ChIP na mapování histonových modifikací ve vzdálených regulačních oblastech myši microRNA miR-155.

Pro detekci histonových modifikací metodou ChIP jsme využili Fast SYBR Green master Mix. Tento mix je určený pro analýzu vzorků pomocí metody qPCR s kvantifikací amplifikovaných DNA fragmentů pomocí fluorescenčního DNA barviva SYBR Green. SYBR Green je cyaninové interkalační DNA barvivo, které se po navázání na dvouvláknovou DNA stává silně fluorescenční. Protože fluorescence SYBR Green nenavázaného na DNA je velmi nízká, je nárůst fluorescence vzorku na konci elongační fáze PCR reakce přímo úměrný množství amplifikovaných fragmentů. Výhodou tohoto systému je, že je levný, jednoduchý a nevyžaduje použití sondy (pro každou unikátní namnoženou sekvenci). Zároveň se vyznačuje vysokou senzitivitou, což je pro detekci přítomnosti určitých histonových modifikací výhodné.

Označení primeru

Sekvence primeru

mmu-miR-155 (-15,13kb) F	TGCCACAGCAACTGTGTATGGGTC
mmu-miR-155 (-15,13kb) R	TGCTAAAGGTGCTGGCTACCAGG
mmu-miR-155 (-11,4kb) F	AGCATCAGGGCAACCCACACA
mmu-miR-155 (-11,4kb) R	TGGGTTTGCCGTTTCCTGCTT
mmu-miR-155 (-7,44kb) F	GCTCTGCACTGGCTCTGACTTCTG
mmu-miR-155 (-7,44kb) R	GTACCAAGGATGACTGCGGTGGA
mmu-miR-155 (-7kb) F	GCCAGTTCTACTGTGCTGCTCAGATG
mmu-miR-155 (-7kb) R	CATGGGCGAGCATGGTGTGAGAGC

mmu-miR-155 (-6kb) F	CGCTAAGAAATGGAGCATGTGTATCCC
mmu-miR-155 (-6kb) R	AATGTTCCAGCCTCTATATGGAATCCAG
mmu-miR-155 (-2,7kb) F	AACTGGAAGACCAAGATGGAGGCTG
mmu-miR-155 (-2,7kb) R	AGGTGAAGGTGACCTGAGGAGATGC
mmu-miR-155 (-1,5kb) F	TGTGCTGGGTTCACAGATACTACAGG
mmu-miR-155 (-1,5kb) R	TCCATTAGCTTGTAGAGGTTGAGCAAGC
mmu-miR-155 (-0,6kb) F	ACAGTTGTTTGTCTTTAGGATGCCCCACG
mmu-miR-155 (-0,6kb) R	CAGTGATTTCGGAATGAGCAACAGGTC
mmu-miR-155 (0,3kb) F	ACAGAGTTAGGCACCTGTGACATGGC
mmu-miR-155 (0,3kb) R	ACAGAAGCTCAAGGGTTAGCCAGGC
mmu-miR-155 (1,1kb) F	TAGGCTACTTAGTTCTCAGAGCAATGCC
mmu-miR-155 (1,1kb) R	AATCGAGGTAATACCACCTATCCTGCC
mmu-miR-155 (7kb) F	CCTCATTGCACTGTAGGAAGTTCCACC
mmu-miR-155 (7kb) R	TGCTCTAGCCTGGCTTCTGTTCTCAG

Rovnice popisující standardní křivky dvojic primerů použitých v metodě ChIP.

Primery na ChIP

Rovnice popisující standardní křivky

mmu-miR-155 (-15,13kb)	$y = -3,778x + 46,511$
mmu-miR-155 (-11,4kb)	$y = -3,5405x + 44,209$
mmu-miR-155 (-7,44kb)	$y = -3,8618x + 45,671$
mmu-miR-155 (-7kb)	$y = -3,1313x + 39,593$
mmu-miR-155 (-6kb)	$y = -3,0137x + 39,538$
mmu-miR-155 (-2,7kb)	$y = -3,7738x + 40,877$
mmu-miR-155 (-1,5kb)	$y = -3,8918x + 43,216$
mmu-miR-155 (-0,6kb)	$y = -3,6173x + 40,358$
mmu-miR-155 (0,3kb)	$y = -3,0637x + 37,05$
mmu-miR-155 (1,1kb)	$y = -3,6026x + 40,419$
mmu-miR-155 (7kb)	$y = -3,1991x + 39,27$

Protilátky

Označení protilátky	Použití	Výrobce	Kat.číslo
FITC-anti-mouse B220	FACS	Biolegend	103206
APC-anti-mouse Mac-1/CD11b	FACS	Biolegend	101212
FITC-anti-mouse Gr-1	FACS	Biolegend	108406
PE-anti-mouse c-Kit/CD117	FACS	Biolegend	105808
Briliant violet 421-anti-mouse c-Kit/CD117	FACS	Bilolegend	105827
APC-anti-mouse Ter119	FACS	Biolegend	116212
biotin-anti-mouse CD3	FACS	eBioscience	13-0031-85
APC-anti-mouse Sca-1	FACS	Biolegend	108112
FITC-anti-mouse Lineage cocktail Lin	FACS	Biolegend	78022
Rabbit anti PU.1	FACS	Santa Cruz Technology	sc-352
Alexa fluor 488 goat anti rabbit IgG	FACS	Invitrogen	46483A
anti-v-Myb/c-myb	IMUNO	Abcam	ab45150
Anti-FITC MicroBeads	MACS	Miltenyi Biotech	130-048-701
Anti-H3K9acetyl	ChIP	Upstate	07-352
Anti-Histone H3K9trimetyl	ChIP	Abcam	ab8898
Anti-Histone H3	ChIP	Abcam	ab1791
Normal Rabbit IgG	ChIP	EMD Biosciences	NI01

Enzymy

Označení enzymu	Výrobce	Kat.číslo
TaKaRa LA Taq™ Hot Start Version	Takara Bio	RR042A
Proteinase K	Sigma-Aldrich	P4850
Deoxyribonuclease I (DNase I)	Fermentas	EN0521
Ribonuclease A (RNase A)	Sigma-Aldrich	R4642
Diaminobenzidin (DAB)	Dako	

Chemikálie

Označení chemikálie	Výrobce	Kat.číslo
Agarose I	Amresco	0710
Albumin, from bovine serum (BSA)	Sigma-Aldrich	A2153
D(+) - Glucose Anhydrid	Amresco	50-99-7
Dimetylsulfoxid	Carl Roth GmbH	A994.2
DMRIE-c	Life Technologies	10459-014
dNTPs Mix (nukleotidy)	Takara Bio	4030
Dodecyl sulfat sodný	Amresco	M107
EDTA	Riedel-deHaën	27270
EGTA	Amresco	0732
Etanol 99% p.a.	Penta	02862 1
Ethidium bromid, EtBr	Amresco	1239-45-8
Fast SYBR Green master Mix	Life Technologies	4385612
Fenol	Sigma	P4557
Ficoll-Paque PREMIUM gradient	GE Healthcare	17-5442-03
Formaldehyd 37% roztok	Sigma-Aldrich	252549
Glycin	Amresco	0167
Glycerol	Amresco	0854
Glycogen RNA grade (20mg/mL)	Fermentas	R0551
Haematoxylin/eosin	Dako	SL029
Heparin	Zentiva	
HEPES	Amresco	0485
Histidin	Exbio	
Histofin	Nichrei Biosciences	414341F
hsa-miR-155 anti-miRNA inhibitor	Ambion	AM12601
Chlorid amonný	Petr Lukeš	ES 235-186-4
Chlorid sodný	Amresco	0241
Chloroform p.a.	Penta	25692 1
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich	I8896
Interleukin 3 (mIL3)	Cell Signaling Technologies	8923SC

Isopropylalkohol p.a.	Petr Švec – Penta	59300 1
Kyselina boritá	Amresco	0821C158
Kyselina mravenčí	Sigma-Aldrich	F0507-1L
LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus) (10x)	Takara Bio	P 2317
Lineární akrylamid	Life Technologies	AM9520
MassRuler™ DNA Ladder, Low range	Fermentas	SM0383
6x MassRuler™ Loading Dye solution	Fermentas	R0621
Metanol	Penta	21230-12500
mmu-miR-155 anti-miRNA inhibitor	Life Technologies	AM13058
Myb siRNA (mmu)	Santa Cruz	sc-29856
MYB siRNA (hsa)	Santa Cruz	sc-29855
negative control#1 siRNA	Ambion	4457289
NP-40	Sigma-Aldrich	127087-87-0
Nuclease eliminator	Amresco	E891
Nuclease-free water, sterile	Amresco	2320C006
p53 siRNA (myší)	Santa Cruz	sc-29436
p53 siRNA (lidská)	Santa Cruz	sc-29435
Paraformaldehyd	Penta	30525-89-4
PBS – Dulbecco (10x)	Biochrom AG	L1835
Pepton	Sigma-Aldrich	68971
Protease Inhibitor Cocktail (P8340)	Sigma-Aldrich	P8340
Protein-A-agarosa	Sigma-Aldrich	P7786
Protein-G-Agarosa	Sigma-Aldrich	P4691
RiboZol	Amresco	N580
SYBRgreen Master Mix	LifeTechnologies	4368702
TaqMan Universal master Mix II	Life Technologies	4427788
Thiokyanát sodný	Sigma-Aldrich	251410
Tris-HCl Ultrapure grade	Amresco	0234
Triton X-100	Amresco	0694
Universal Probe Library (UPL) set	ROCHE	4683633001

Roztoky a pufrы

Zásobní roztoky

- **0,2 M EGTA (pH 8)** (skladovat: RT)

7,607 g EGTA bylo rozpuštěno v 80 ml ddH₂O, pH bylo upraveno nasyceným roztokem NaOH a roztok doplněn vodou do 100 ml

- **0,5 M EDTA (pH 8)** (skladovat: RT)

73,06 g EDTA bylo rozpuštěno ve 400 ml ddH₂O, za stálého míchání byly přidávány pecičky NaOH do doby, než roztok dosáhl pH 8 (EDTA je při pH nižším než 8 ve vodě nerozpustná). Po kompletním rozpuštění EDTA byl roztok doplněn vodou do 500 ml, přefiltrován (filtr s propustností 300 µm) a sterilizován v autoklávu.

- **1 M HEPES – KOH (pH 7,5)** (skladovat: RT)

23,83 g HEPES bylo rozpuštěno v 80 ml sterilní ddH₂O, pH bylo upraveno nasyceným roztokem KOH a roztok doplněn vodou do 100 ml

- **1 M Tris-HCl (pH 8)** (skladovat: RT)

30,285 g Trisma base bylo rozpuštěno ve 200 ml ddH₂O, pH bylo upraveno pomocí 37% HCl a roztok doplněn vodou do 250 ml

- **1 M KCl** (skladovat: RT)

7,455 g KCl bylo rozpuštěno v 80 ml ddH₂O a roztok doplněn vodou do 100 ml

- **2,5 M glycin** (skladovat: RT)

7,507 g glycinu bylo rozpuštěno ve 30 ml ddH₂O a roztok byl doplněn vodou do 40 ml

- **5 M NaCl** (skladovat: RT)

73,05 g NaCl bylo rozpuštěno ve 200 ml ddH₂O a roztok doplněn vodou do 250 ml

- **10% SDS** (skladovat: RT)

40 g SDS bylo rozpuštěno ve 300 ml ddH₂O a roztok doplněn vodou do 400 ml, nesterilizováno v autoklávu

- **70% etanol** (skladovat: RT)

36,458 ml 96% EtOH bylo za stálého míchání ředěno sterilizovanou ddH₂O do výsledného objemu 50 ml

- **3M acetát sodný** (skladovat: RT)

40,824 g NaAc x 3H₂O bylo rozpuštěno v 80 ml ddH₂O a poté byl roztok doplněn vodou do 100 ml

- **1000x EtBr**(skladovat: RT)

0,5 mg EtBr bylo rozpuštěno v 1 ml ddH₂O

Pufry a roztoky vlastní výroby

Pufr TE (skladovat: RT)		<u>výsledná koncentrace</u>
1 M Tris-HCl (pH 7,5)	1 ml	10 mM
0,5 M EDTA (pH 8)	0,2ml	1 mM
ddH ₂ O doplněno do 100ml a vysterilizováno		<u>celkem: 100 ml</u>

10x Pufr TBE (Tris – borátový) (skladovat: RT)		<u>výsledná koncentrace</u>
Trizma base	107,8146 g	890 mM
H ₃ BO ₃	55, 0287 g	890 mM
0,5 M EDTA (pH 8)	40 ml	20 mM
ddH ₂ O doplněno do 1000 ml a vysterilizováno		<u>celkem: 1000 ml</u>

Digest DNA (protein lyzující) pufr (genomická DNA) (skladovat: RT)

	<u>výsledná koncentrace</u>	
5 M NaCl	2 ml	100 mM
1 M Tris-Hcl (pH 8,0)	1 ml	10 mM
0,5 mM EDTA (pH 8,0)	5 ml	25 mM
10% SDS	5 ml	0,5%
ddH ₂ O doplněno do 100 ml a vysterilizováno		<u>celkem: 100 ml</u>

MACS pufr (skladovat: 4 °C)		<u>výsledná koncentrace</u>
albumin z bovinního séra	2,5 g	0,5%
EDTA	0,4 g	2 mM
PBS	4,9 g	1%
ddH ₂ O doplněno do 500 ml a vysterilizováno		<u>celkem: 500 ml</u>

Pufr pro lyzování erythrocytů v krvi (skladovat: 4 °C) **výsledná koncentrace**

NH ₄ Cl	8,34g	0,15 M
NaCl	1 g	17 mM
EDTA	0,037 g	0,1 mM
ddH ₂ O doplněno do 1000 ml a vysterilizováno		<u>celkem: 1000 ml</u>

11% roztok formaldehydu (ChIP) (skladovat: 4 °C) **výsledná koncentrace**

37% formaldehyd	74,5 ml	11%
5 M NaCl	5 ml	100 mM
0,5 M EDTA (pH 8)	0,5 ml	1 mM
0,2 M EGTA (pH 8)	0,625 ml	0,5 mM
1 M HEPES-KOH (pH 8)	12,5 ml	50 mM
ddH ₂ O	156,9 ml	<u>celkem: 250 ml</u>

Lyzační pufr I (ChIP) (skladovat: 4°C) **výsledná koncentrace**

1 M HEPES-KOH (pH 7,5)	5 ml	50 mM
5 M NaCl	2,8 ml	140 mM
0,5 M EDTA	0,2 ml	1 mM
100% glycerol	10 ml	10%
10% NP-40	5 ml	0,5%
Triton X-100	0,25 ml	0,25%
ddH ₂ O	76,75 ml	<u>celkem: 100 ml</u>

Lyzační pufr II (ChIP) (skladovat: 4°C) **výsledná koncentrace**

0,5 M EDTA (pH 8)	0,2 ml	1 mM
0,2 M EGTA (pH 8)	0,25 ml	0,5 mM
1 M Tris-HCl (pH 8)	1 ml	10 mM
5 M NaCl	4 ml	200 mM
ddH ₂ O	94,55 ml	<u>celkem: 100 ml</u>

<u>Lyzační pufr III (ChIP) (skladovat: 4°C)</u>		<u>výsledná koncentrace</u>
0,5M EDTA (pH 8)	0,2 ml	1 mM
0,2M EGTA (pH 8)	0,25 ml	0,5 mM
1M Tris-HCl (pH 8)	1 ml	10 mM
ddH ₂ O	98,55 ml	celkem: 100 ml

<u>Imunoprecipitační Paro's pufr (ChIP) (skladovat: 4°C)</u>		<u>výsledná koncentrace</u>
10% SDS	1 ml	0,02%
Trion X-100	10 ml	2 %
0,5 M EDTA	4 ml	4 mM
1 M Tris-HCl (pH 8)	20 ml	40 mM
5 M NaCl	30 ml	300 mM
ddH ₂ O	435 ml	celkem: 500 ml

<u>Promývací pufr Paro's I (ChIP) (skladovat: 4°C)</u>		<u>výsledná koncentrace</u>
10% SDS	5 ml	0,1%
Triton X-10	5 ml	1%
0,5 M EDTA (pH 8)	2 ml	2 mM
1 M Tris-HCl (pH 8)	10 ml	20 mM
5 M NaCl	15 ml	50 mM
ddH ₂ O	463ml	celkem: 500 ml

<u>Promývací pufr Paro's II (ChIP) (skladovat: 4°C)</u>		<u>výsledná koncentrace</u>
10% SDS	5 ml	0,1%
100% Triton X-10	5 ml	1%
0,5 M EDTA (pH 8)	2 ml	1%
1 M Tris-HCl (pH 8)	10 ml	20 mM
5 M NaCl	50 ml	500 mM
ddH ₂ O	428 ml	celkem: 500 ml

Pufr proteinázy K (ChIP) (skladovat: RT)		výsledná koncentrace
10% SDS	12,5 ml	0,5%
0,5 M EDTA (pH 8)	12,5 ml	25 mM
1 M Tris-HCl (pH 8)	2,5 ml	10 mM
5 M NaCl	5 ml	100 mM
ddH ₂ O	217,5 ml	celkem: 250 ml

Média, buněčná kultivace

Médium, kultivační substrát	Výrobce	Kat. číslo
FBS	Biochrom AG	S0115
IMDM	Invitrogen	I3390
RPMI-1640	Sigma-Aldrich	R7388
MethoCult M3434	StemCell Technologies	M3434
Opti-MEM® I	Invitrogen	31985
Penicillin-Streptomycin solution	Amresco	K952

Medium pro *Saccharomyces cerevisiae* (ChIP)

Yeast extract	2,5 g	1%
Pepton bacteriological	5 g	2%
Glucose	5 g	2%
celkem 250 ml		

Byl připraven 20% roztok glukózy a roztok Yeast extraktu s peptonem. Po klávení (20 min, 120 °C a 2 ATM) a ochlazení na 60 °C, byly oba roztoky smíchány.

IMDM

(79% IMDM, 20% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, Interleukin 3 (mIL3))

Do 50 ml zkumavky Falcon bylo pipetováno 40 ml IMDM, 10 ml FBS, 500 µl Penicillin/Streptomycin a 125 µl mIL3. Výsledná koncentrace antibiotik v médiu odpovídá 100 U/ml a 100 µg/ml.

RPMI-1640

(89% IMDM, 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin)

Do 50 ml zkumavky Falcon bylo pipetováno 45 ml IMDM, 5 ml FBS, 500 μ l Penicillin/Streptomycin. Výsledná koncentrace antibiotik v mediu odpovídá 100 U/ml a 100 μ g/ml.

Komerčně dodávané sady

Komerčně dodávaná sada	Výrobce	Kat. číslo
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen	69504
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	4368814

METODY

Genotypizace

Byla použita zvířata z konvenčního chovu. *Mus musculus*, kmen: C57BL/6J, Trp53tm1Tyj (myš nesoucí mutaci genu Trp53, s inzertovaným genem pro neomycinovou rezistenci). *Mus musculus*, kmen: 129Sv, Sfpi1tm1.3Dgt/J (myš nesoucí hypomorfni mutaci genu PU.1).

Značení myší bylo prováděno metodikou zastřížení posledního prstového článku v ranném poporodním období, kdy bolestivost zákroku je minimální. Odebrané tkáně byly použity pro izolaci genomické DNA na genotypizaci myší.

Izolace DNA

Odebrané tkáně byly lyzovány 5 μ l proteinasy K v 750 μ l Digest DNA (Protein lyzující) pufru, při teplotě 56°C, třepání 750 rpm přes noc. Byl přidán isopropylalkohol v objemu 1:1. DNA byla uchována v isopropylalkoholu přes noc při teplotě -20°C a druhý den vyprecipitována centrifugací při 4°C 30 minut při maximálních otáčkách. DNA peleta byla promyta 500 μ l 75% etanolu, centrifugována při 4°C 10 minut při maximálních otáčkách a následně zbavena zbytků etanolu (jeho odpařením) a rozpuštěna ve 200 μ l TE pufru při 45°C za stálého třepání po dobu 60 minut.

PCR

PCR byla provedena na přístroji Mastercycler Gradient s použitím primerů v koncentraci zásobního roztoku 10 μ M a DNA Polymerasy TaKaRa LA Taq™ s využitím technologie „Hot Start“, jejímž principem je zablokování aktivního centra polymerasy proteinovým inhibitorem, k jehož disociaci dojde až v okamžiku první denaturace v termálním cyklátoru. Tento postup snižuje úroveň nespecifického nasedání primeru. Bylo provedeno 35 cyklů PCR amplifikace.

Teplotní profil pro PCR amplifikaci všech vzorků:

- 1) T=95°C, 3 minuty
- 2) 35 cyklů - (T=95°C , 40 sekund; T=60°C, 40 sekund; T=72°C, 1 minuta)
- 3) T=72°C, 10 minut

4) T=4°C, 5 minut.

Složení PCR směsi pro PCR amplifikaci 1 vzorku p53^{-/-} a PU.1^{ure/ure} myši:

	μl/1 vzorek		μl/1 vzorek
Takara pufr	4,0	Takara pufr	4,0
dNTPs	4,0	dNTPs	4,0
DMSO	0,5	DMSO	0,5
TP53 W-F primer	1,2	PU.1 W-F primer	1,2
TP53 M-F primer	1,2	PU.1 M-F primer	1,2
TP53 WM-R primer	1,2	PU.1 WM-R primer	1,2
TaKaRa polymerasa	0,25	TaKaRa polymerasa	0,25
ddH ₂ O	24,6	ddH ₂ O	24,6
DNA	3,0	DNA	3,0

Detekce produktů PCR pomocí agarosové elektroforesy

K 30 μl namnoženého PCR produktu bylo přidáno 5 μl MassRuler™ Loading Dye Solution a naneseno do jamek DNA elektroforesy 2% agarosového gelu v TBE pufru po dobu 30 minut při 90-110 V. Jako fluorescenční indikátor DNA byl použit ethidiumbromid. Standardem byl 100 bp DNA žebřík MassRuler™ Ladder, Low Range. Detekce vzorků pomocí dlouhovlnné UV lampy, gel byl vyfotografován pomocí fotoaparátu Canon G12.

Separace mononukleárních buněk

Myši byly uvedeny do umělého spánku inhalační anestezií – (ketamin, xylazin), vykrveny z centrální retinální žíly (sinus orbitalis) a usmrceny cervikální dislokací. Byly vyjmuty orgány potřebné pro experimenty a z kostní dřeně byly izolovány mononukleární buňky.

Periferní krev

Z centrální retinální žíly bylo odebráno 0,5-1 ml periferní krve do 1,5 ml centrifugační zkumavky s heparinem. Erytrocyty periferní krve byly zlyzovány

roztokem chloridu amonného (složení viz Materiál) a získané jaderné buňky byly použity pro 1) určení krevního rozpočtu na hemoanalyzeru, 2) krevní nátěr a 3) analýzu na FACS.

Kostní dřev

Mononukleární kostní buňky byly izolovány z vypreparovaných stehenních (femur) a holenních (tibia) kostí myší. Kosti byly propláchnuty injekční stříkačkou s roztokem PBS a 1% BSA (PBS-BSA). Získaná suspenze buněk byla použita pro 1) analýzu na FACS, 2) cytologii a 3) separaci c-Kit⁺ buněk pomocí MACS nebo FACS.

Slezina

Část sleziny byla homogenizována za použití skleněného pístového homogenizátoru. Byla získána buněčná suspenze v roztoku PBS pro analýzu na FACS. Druhá část sleziny byla fixována roztokem 10% formaldehydu a PBS pro cytologii.

PBMC – mononukleární buňky z periférní krve

Vzorek odebrané periférní krve pacientů a zdravých kontrol s AML byl naředěn sterilním PBS v poměru 1:1. Naředěný vzorek byl v poměru 1:1 opatrně navrstven na separační roztok hydrofilního polymeru Ficoll-PaqueTM v 50 ml centrifugační zkumavce. Takto nanesený vzorek byl centrifugován ve výkyvném rotoru za pokojové teploty 20 minut na 2000 otáč./min. Ze vzniklého hustotního gradientu byla na rozhraní dvou fází separována frakce mononukleárních buněk (bílý prstenec). Tato frakce PBMC byla promyta 10 ml PBS centrifugací 5 minut při 4°C na 1250 otáč./min. Takto separované PBMC z AML pacientů byly následně použity pro 1) kryopreservaci: zamrazení buněk v médiu (90% FBS + 10% DMSO) a uchování v tekutém dusíku. 2) Izolaci mRNA/miRNA pro stanovení expresního profilu.

Barvení krevních nátěrů

Kapka periférní, heparizované krve byla rovnoměrně rozetřena na sklo a nechána 5 minut zaschnout při laboratorní teplotě. Pro barvení krevních nátěrů byla použita Pappenheimova panoptická barvicí technika May-Grünwald a Giemsa-Romanowski. Barvení krevního nátěru probíhá ve dvou fázích. V první fázi převládá

účinek metylalkoholu, nátěr se fixuje. V druhé fázi probíhá samotné barvení krevních elementů. Nátěry byly barveny 10-12 minut barvicím roztokem May-Grünwald (1ml/sklíčko) při laboratorní teplotě, opláchnuty pod tekoucí vodou a následně barveny 15-17 minut barvicím roztokem Giemsa-Romanowski (1ml/sklíčko) při laboratorní teplotě. Sklíčko bylo opět opláchnuto pod tekoucí vodou a necháno zaschnout. Hotové nátěry byly vyhodnoceny mikroskopem Leica BME.

Histologie

Pro histologii **sleziny** byly sleziny fixovány roztokem 10% formaldehydu a PBS. Cílem fixace je zachování struktury buněk a tkání ve stavu, který je co nejpodobnější tomu, v němž se vyskytují zaživa. Fixace zastaví metabolické děje a to jejich zpomalením či stabilizací enzymů a dalších proteinů. Kousky parafinem prosycené sleziny byly zality do parafínových bločků. Pomocí mikrotomu Leova byly z parafínového bločku odkrajovány tenké řezy (3-8 μm silné) pro mikroskopické vyhodnocení. Tenké řezy tkání byly poté nalepeny na podložní skla. Po odmytí parafínu, byly řezy barveny kombinací barvení hematoxylinem a eosinem.

Pro histologii **kostní dřeně** byly celé stehenní kosti fixovány roztokem 10% formaldehydu a PBS, dekalcifikovány kyselinou mravenčí po dobu 24 hodin a zality do parafínových bločků. Mikrotomem byly nakrájeny řezy 5 μm silné. Po odmytí parafínu, byly řezy barveny kombinací hematoxylinem a eosinem.

Imunohistochemie (IHC)

IHC využívá mono-či polyklonální značené protilátky (Ab), kterými lokalizujeme a vizualizujeme příslušné tkáňové nebo buněčné antigeny (Ag).

Byly použity deparafinované řezy, které byly inkubovány s protilátkou anti-v-Myb/c-myb v koncentraci 1:100 po dobu 1 hodiny. Vzorky byly promyty PBS, inkubovány s histidinem po dobu 30 minut a následně byl použit Universal Immuno-Enzyme Polymer reagent Histofine podle návodu udávaného výrobcem. Vizualizace byla provedena pomocí chromogenu 3, 3'-diaminobenzidin (DAB) peroxidasou, která reaguje se svým substrátem peroxidem vodíku. Oxidací rozpustného DAB je stabilní

hnědý produkt, nerozpustný v alkoholu, a proto se během dehydratace před montováním řezů nevyplaví.

Průtoková cytometrie

Analýza exprese povrchových antigenů

Z mononukleárních buněk periferní krve, sleziny a kostní dřeně bylo odebráno 5×10^5 buněk a přefiltrováno přes buněčné sítko (40 μm) do kyvety určené pro průtokový cytometr BD FACS Canto II nebo BD FACS Aria Ilu (umožňuje třídění buněk podle antigenů), doplněno do objemu 3 ml roztokem 1x PBS obsahující BSA (5g/100ml) a centrifugováno při 4°C 5 minut na 1490 otáč./min. Po centrifugaci byla peleta resuspendována v objemu PBS/BSA 100 μl . Mononukleární buňky periferní krve, sleziny a kostní dřeně byly inkubovány s protilátkami (1:100, s modifikacemi dle doporučení výrobce): APC-anti-mouse Mac-1/CD11b [M1/70], FITC-anti-mouse Gr-1 [RB6-8C5], FITC-anti-mouse B220 [RA3-6B2], PE-anti-mouse c-Kit/CD117 [2B8], APC-anti-mouse Ter119 [Ter-119], APC-anti-mouse Sca-1 [D7] a (2:100) FITC-anti-mouse Lineage cocktail Lin [145-2C11, RB6-8C5, M1/70, RA3-6B2, Ter119] po dobu 30 minut na ledu a ve tmě. Následně byly buňky promyty ve 3 ml PBS/BSA centrifugací při 4°C 5 minut na 1490 otáč./min. Peleta buněk byla resuspendována v 300 μl PBS/BSA a buňky byly použity k analýze exprese povrchových antigenů na průtokovém cytometru BD FACS Canto II nebo BD FACS Aria Ilu vybavených modrým (488 nm), červeným (633 nm) a fialovým (405 nm) laserem. Na BD FACS Aria Ilu byla alternativně pozitivní populace ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^- \text{c-Kit}^+$ a $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+$) vytríděna do zvlášť k tomu určené kyvety s PBS. Experiment byl připraven na základě kontrolního měření autofluorescence neznačených buněk (negativní kontrola). Před měřením více antigenů zároveň v jedné kyvetě byla na základě měření exprese každého flouoroforu (PE, FITC, APC) samostatně v jednotlivých kyvetách provedena kompenzace signálů.

Vyhodnocení měření bylo provedeno v rámci prostředí programu FACSDiva Software v.6.1.3. Použity byly funkce „Biexponential display“ pro zobrazení exprese

povrchových antigenů uvnitř bodového grafu a funkce „Polygon gate“ pro separaci buněčných populací určitého fenotypu.

Analýza proteinové úrovně PU.1

Pro měření nitrobuněčné přítomnosti jaderného transkripčního faktoru PU.1 byl využit protokol dle recentní publikace (Noel 2012). Krátce, mononukleární suspenze 1×10^8 buněk kostní dřeně byla přefiltrována přes buněčné sítko ($40 \mu\text{m}$) do kyvety určené pro průtokový cytometr BD FACS Canto II, doplněna do objemu 3 ml roztokem PBS/BSA a centrifugována při 4°C 5 minut na 1490 otáč./min. Po centrifugaci byla buněčná peleta ponechána ve zbytkovém objemu PBS/BSA cca $100 \mu\text{l}$ a inkubována s protilátkami ($1 \mu\text{l}$ protilátky/vzorek) APC-anti-mouse Mac-1/CD11b [M1/70] a Brilliant violet 421-anti-mouse c-Kit/CD117 [2B8] po dobu 30 minut na ledu a ve tmě. Současně byla preinkubována primární králičí polyklonální protilátka anti-PU.1 ($100 \mu\text{l}$ anti PU.1 + $100 \mu\text{l}$ PBS/BSA/zkumavku) po dobu 2 hodin při pokojové teplotě. Následně byly buňky promyty ve 3 ml PBS/BSA centrifugací při 4°C 5 minut na 1490 otáč./min. Peleta buněk byla fixována 1% paraformaldehydem ($200 \mu\text{l}$ /zkumavka) po dobu 40 minut při pokojové teplotě. Následně byly buňky třikrát promyty po 3 ml PBS/BSA centrifugací při 4°C 5 minut na 1490 otáč./min. Peleta buněk byla permeabilizována 70% etanolem (vychlazeným na -20°C) po dobu 30 minut na ledu. Následně byly buňky 3krát promyty po 3 ml PBS/BSA centrifugací při 4°C 5 minut na 1490 otáč./min. K peletě buněk bylo přidáno $10 \mu\text{l}$ IgG, promícháno na míchačce vortex a po 10 minutách/RT bylo přidáno $200 \mu\text{l}$ preinkubovaného roztoku (anti-PU.1 protilátka + PBS/BSA) a inkubováno po dobu 30 minut/RT. Následně byly buňky dvakrát promyty po 3 ml PBS/BSA centrifugací při 4°C 5 minut na 1490 otáč./min. Peleta buněk byla inkubována s $1 \mu\text{l}$ /vzorek sekundární protilátky Alexy Fluor 488 Goat anti rabbit po dobu 30 minut při pokojové teplotě a ve tmě. Následně byly buňky třikrát promyty po 3 ml PBS/BSA centrifugací při 4°C 5 minut na 1490 otáč./min. Na závěr byly buňky fixovány 1% paraformaldehydem ($200 \mu\text{l}$ /zkumavka) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě.

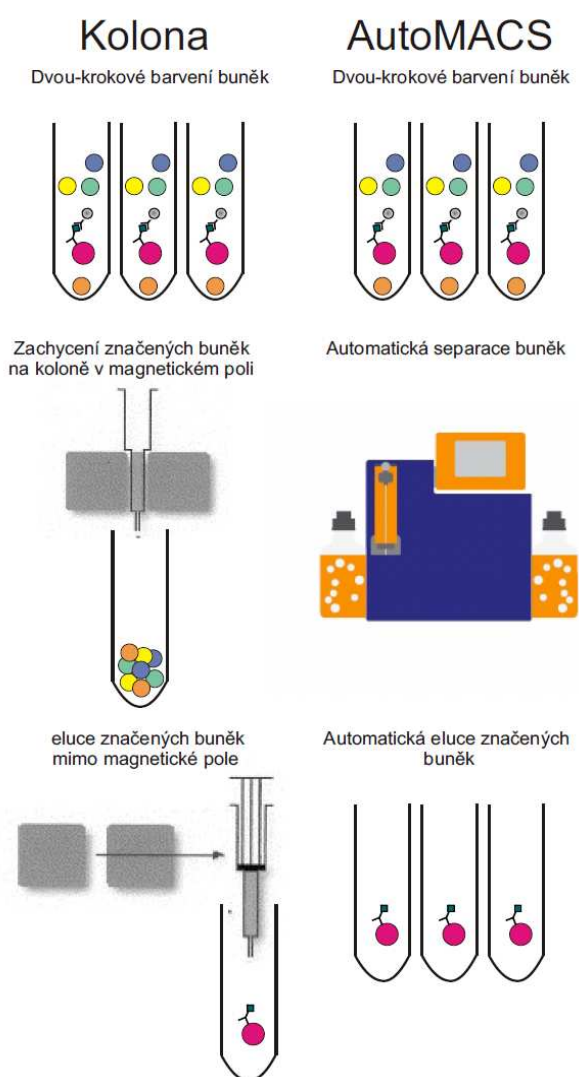
Metodou průtokové cytometrie na BD FACS Canto II byly buňky nejprve označeny podle pozitivní exprese povrchových antigenů $\text{Mac1}^+/\text{c-Kit}^+$ a následně byla v těchto buňkách sledována primární PU.1 protilátka pomocí pozitivitu na sekundární

protilátku Alexa Fluor 488. Experiment byl připraven na základě změření autofluorescence neznačených, nefixovaných a nepermeabilizovaných buněk, neznačených, ale fixovaných a permeabilizovaných buněk. Kompenzace signálů byla provedena na základě měření exprese každého flouoroforu (Briliant violet 421, APC, Alexa fluor 488) samostatně v jednotlivých kyvetách. Vyhodnocení měření bylo provedeno v rámci prostředí programu FACSDiva Software v.6.1.3.

Magnetická separace

Pro zvolené experimenty je velmi důležitá čistota populací a viabilita buněk. Pro separaci c-Kit⁺ buněk byla opakovaně používána magnetická separace (**Obrázek 11**) s následným ověřením čistoty buněčných populací pomocí průtokové cytometrie. Z mononukleární suspenze 1×10^8 kostních buněk byla odseparována populace c-Kit⁺ buněk na přístroji AutoMACS Pro Separator (pro izolaci RNA) nebo na kolonách (separace za sterilních podmínek pro transfekční a koloni-formní assay). Byla použita protilátka FITC-anti-mouse c-Kit/CD117 [2B8]. Následně byly c-Kit⁺ buňky inkubovány s magnetickými anti-FITC MicroBeads dle návodu výrobce a odseparovány na přístroji za použití programů Posel nebo Depl05 nebo na koloně v magnetickém poli.

Obrázek 11: Magnetická separace buněk. Buňky jsou dvou-krokovým barvením naznačeny anti-FITC MicroBeads, (**vlevo**) naneseny na kolonu (Miltenyi Biotec) a zachyceny



v magnetickém poli. Následně jsou eluovány z kolony mimo magnet. (**vpřavo**) Automaticky separovány a eluovány pomocí přístroje AutoMACS Pro Separator.

Izolace RNA a přepis do cDNA

Izolace RNA

Peleta ($1-3 \times 10^6$ buněk) magneticky separovaných c-Kit⁺ buněk kostní dřeně nebo mononukleárních buněk z periférní krve z AML pacientů byla lyzována v 400 μ l RiboZolu a ponechána 10 minut na pokojové teplotě. K buněčnému lyzátu bylo přidáno 100 μ l předchlazeného chloroformu, promícháno na míchačce vortex po dobu 15 sekund a centrifugováno při pokojové teplotě 8 minut na 11000 otáč./min. Po centrifugaci byla horní vodná čirá fáze přenesena do nové 1,5 ml centrifugační zkumavky, spojená s chloroformem v objemu 1:1, promíchána a centrifugována stejně jako v předchozím kroku. Svrchní vodná fáze byla přenesena do nové 1,5 ml centrifugační zkumavky a byl k ní přidán 1 μ l lineárního akrylamidu a 500 μ l isopropylalkoholu. RNA byla uchována v isopropylalkoholu přes noc při teplotě -20°C a druhý den vyprecipitována centrifugací při 4°C , 40 minut na 14000 otáč./min. mRNA peleta byla promyta 200 μ l 80% etanolu, centrifugována při 4°C 5 minut na 14000 otáč./min. a následně zbavena zbytků etanolu (jeho odpařením) a rozpuštěna ve 12 μ l vody bez nukleás s RNA inhibitory. Kvalita (integrita) mRNA byla ověřena na přístroji Bioanalyzer 2100 podle návodu udávaného výrobcem. Koncentrace a čistota mRNA byla stanovena na přístroji Spectrophotometer ND-1000, tak aby poměr absorbancí A260/A280 byl v rozmezí 1,8-2,0.

Přepis mRNA do cDNA

100 ng mRNA (izolované z c-Kit⁺ buněk nebo PBMC) bylo použito na přepis do cDNA pomocí High Capacity cDNA Reverse Transcription Kitu v celkovém reakčním objemu 15 μ l. Reverzní transkripce se specifickými primery proběhla na přístroji Mastercycler Gradient. Přepsaná cDNA byla naředěna vodou do konečného objemu 50 μ l a uchována na -20°C k dalšímu použití.

Teplotní profil pro reverzní transkripci RNA:

- 1) T=16°C, 30 minuty
- 2) T=42°C, 30 minut
- 3) T=85°C, 5 minut
- 4) T=4°C, 5 minut.

Složení směsi pro reverzní transkripci myší a lidské RNA:

	μl/1 vzorek		μl/1 vzorek
10x RT pufr	1,5	10x RT pufr	1,5
dNTPs	0,4	dNTPs	0,4
RNase inhibitor	0,1	RNase inhibitor	0,1
Random primer	0,5	Random primer	0,5
5x snoRNA202 primer	1,5	5x RNU44 primer	1,5
5x mmu-miR-155 primer	1,5	5x hsa-miR-155 primer	1,5
RT enzym	1,0	RT enzym	1,0
RNA	100 ng	RNA	100 ng
H ₂ O bez RNase	do 15 μl	H ₂ O bez RNase	do 15 μl

Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) a vyhodnocení mRNA exprese

Pro RT-qPCR reakci byly připraveny tři oddělené směsi: cDNA-směs pro každý jednotlivý vzorek, primer-směs s duálně značenou sondou Roche (TaqMan) pro každý jednotlivý gen, jehož exprese byla studována a primer-směs pro referenční (host-keeping) gen snoRNA202 (RNU44) a microRNA mmu-miR-155 (hsa-miR-155). Následně byly tyto reakční směsi postupně napipetovány na destičku o 384 jamkách tak, aby do každé jamky byla napipetována kombinace jedné cDNA směsi (4 μl) a jedné primer směsi (4 μl). Celkový objem RT-qPCR reakce na jednu jamku byl 8 μl. Každá RT-qPCR reakce (unikátní kombinace cDNA směsi a primer směsi) byla v daném experimentu napipetována jako duplikát. RT-qPCR proběhla na přístroji 7900HT Fast Real-time PCR System. Přístroj četl fluorescenční signál ve fázi polymerizace i při nasedání primerů na templát.

Složení PCR reakce s barvivem TaqMan (pro jednu jamku):

- 1) cDNA-směs: TaqMan Universal master Mix II 2 μ l; voda 1,2 μ l; cDNA 0,8 μ l
- 2) primer-směs s duálně značenou sondou Roche (TaqMan): TaqMan Universal master Mix II 2 μ l; voda 1,7 μ l; primer 0,2 μ l; duálně značená sonda Roche 0,1 μ l
- 3) směs primerů (snoRNA202; mmu-miR-155, RNU44; hsa-miR-155): TaqMan Universal master Mix II 2 μ l; voda 1,6 μ l; primer 0,4 μ l;

Program pro PCR reakci:

Počáteční denaturace ($T = 95^{\circ}\text{C}$, 10 minut); 40 cyklů ($T = 95^{\circ}\text{C}$, 15 sekund; $T = 60^{\circ}\text{C}$; 1 minuta)

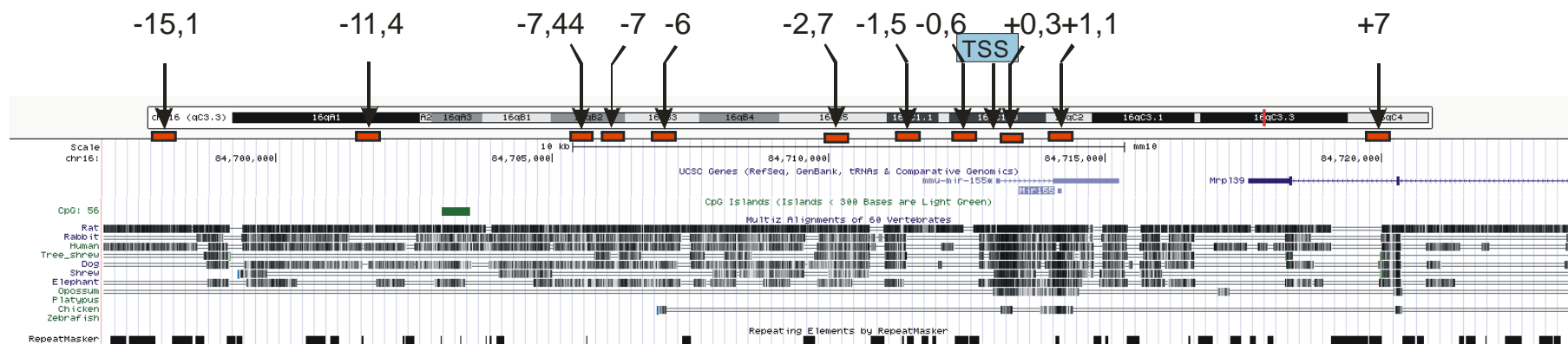
Vyhodnocení qPCR:

C_T hodnoty (hodnota PCR cyklu, kdy amplifikační křivka překročí prahovou hodnotu fluorescenčního signálu umístěnou do fáze exponenciálního růstu kopií PCR produktu) pro specifický PCR produkt/gen ($C_{T\text{spec}}$) byly odečteny od C_T hodnot pro příslušný normalizační gen ($C_{T\text{norm}}$). Relativní hodnota exprese mRNA byla vypočtena jako průměr hodnot $2^{-(C_{T\text{norm}} - C_{T\text{spec}})}$ v duplikátu pro každý vzorek s určením standardní chyby měření. Hodnoty byly vyneseny do grafů a statisticky analyzovány. Pro analýzu byl použit také Studentův t-test.

Chromatinová imunoprecipitace

K 2×10^6 magneticky separovaných c-Kit⁺ buněk kostní dřeně bylo inkubováno s 7×10^7 buněk *Saccharomyces Cerevisiae* a 1% formaldehydem po dobu 10 min při pokojové teplotě. Další zpracování bylo provedeno způsobem popsáním v odborné literatuře (Burda et al., 2009). Při imunoprecipitaci byly použity protilátky Anti-H3K9acetyl (1 μ l na jeden vzorek IP), Anti-Histone H3K9trimetyl, Anti-Histone H3 a kontrolní protilátka Normal Rabbit IgG (5 μ l na jeden vzorek IP). DNA z imunoprecipitátů byla změřena pomocí RT-qPCR v namnožených úsecích nacházejících se v oblasti (-15,13 až +7 kb od transkripčního počátku genu *MIR155HG*). Úseky amplikonů pro PCR jsou anotovány v UCSC (**Obrázek 12**). Primery použité v RT-qPCR a standardní křivky pro RT-qPCR reakce s těmito primery jsou uvedeny v části Materiál/Primery.

[lokalizace ampliconů, [kb] ve vztahu k TSS]



Obrázek 12. Genový lokus *MIR155HG* (-15,1 až +7 kb od místa transkripčního počátku) jako snímek programu UCSC browser. Obrázek ukazuje míru evolučního zakonzervování určitých úseků DNA naznačující jejich význam pro regulaci genové exprese. Zakonzervování je zjišťováno srovnáním sekvencí DNA různých savců (potkan, králík, člověk, rejsek, pes, slon). Šípkami jsou naznačeny pozice úseků namnožených pomocí RT-PCR udávané v kb ve vztahu k místu transkripčního počátku genu *MIR155HG*, modrý box nad schématem udává přibližnou pozici transkripčního počátku (TSS).

Složení PCR reakce s barvivem SYBR (pro jednu jamku):

- 1) cDNA směs: Fast SYBR Green master Mix 2 µl; voda 1,5 µl; cDNA 0,5 µl
- 2) směs primerů Fast SYBR Green master Mix 2 µl; voda 1,7 µl; primer 0,3 µl

Program pro PCR reakci:

Počáteční denaturace (T = 95°C, 10 minut); 40 cyklů (T = 95°C, 10 sekund; T = 60°C, 20 sekund; T = 72°C; 30 sekund).

Vyhodnocení qPCR:

Přítomnost epigeneticky významných modifikací histonů v chromatinu („procento inputu“) je definována jako počet kopií specifického úseku DNA v každém imunoprecipitátu vztažená k počtu kopií téhož úseku v inputu použitým pro imunoprecipitaci v ředění 1:100 (1% input DNA). Od hodnot „nabohacení“ (procenta inputu) získaných imunoprecipitací se specifickou protilátkou byla odečtena hodnota „nabohacení“ (procenta inputu) pro kontrolní, nespecifickou protilátku.

Transientní transfekce**Transfekce c-Kit⁺ buněk pomocí lipofilního činidla DMRIE-c**

24 hodin před transfekcí bylo na 6ti jamkové destičky naseto 2×10^5 magneticky separovaných (na koloně) c-Kit⁺ buněk kostní dřeně. Buňky byly hodinu před transfekcí promyty 1xPBS a přeneseny do 300 µL čerstvého média bez antibiotik (90% IMDEM, 10%FBS). V prvním kroku bylo inkubováno transfekční činidlo 3µL DMRIE-c se 100 µL Opti-MEM (na 1 jamku) po dobu 30 minut při pokojové teplotě. V druhém kroku byly připraveny tyto transfekční směsi oligonukleotidů: (pro 1 jamku)

- 1) 30 nM Myb siRNA + 0,1 µg pMAX GFP + 100 µL Opti-MEM
- 2) 30 nM p53 siRNA + 0,1 µg pMAX GFP + 100 µL Opti-MEM
- 3) 100 nM mmu-miR-155 anti-miRNA inhibitor + 0,1 µg pMAX GFP + 100 µL Opti-MEM
- 4) 0,2 µg pEBB-PU.1-HA + 0,1 µg pMAX GFP + 100 µL Opti-MEM
- 5) 30 nM negativní kontrola siRNA + 0,1 µg pMAX GFP + 100 µL Opti-MEM
- 6) 100 nM negativní kontrola anti-miRNA inhibitor + 0,1 µg pMAX GFP + 100 µL Opti-MEM

- 7) 0,2 μg kontrolního pcDNA plasmidu (SK+) + 0,1 μg pMAX GFP + 100 μL Opti-MEM

Ke každé směsi bylo přidáno 100 μL roztoku Opti-MEM/DMRIE-c, připraveného v prvním kroku a inkubováno 20 minut při pokojové teplotě. Připravené směsi byly smíchány se suspenzí c-Kit⁺ buněk a po 6 hodinách bylo přidáno 500 μL IMDM média (40% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin). Po 12 hodinách se metodou průtokové cytometrie změřila GFP pozitivita transfekovaných buněk (účinnost transfekce byla 85-95%). Po 36 hodinách (Myb siRNA), 72 hodinách (anti-miR-155) nebo 120 hodinách (p53 siRNA) kultivace při 37°C a 5% atmosféře CO₂, byly buňky dále využity pro izolaci mRNA a následnou RT-qPCR analýzu (PU.1, Myb, miR-155, p53, p21 a cílových genů PU.1) nebo kvantifikaci hematopoetických koloniformních jednotek CFU (Haematopoietic Colony Assays).

Transfekce NB4 buněk pomocí nukleofektoru AMAXA

Lidká buněčná AML linie NB4 byla elektroporována lidským B-buněčným nukleofekčním kitem (Human B-cells nucleofection kit) za použití nukleofektoru AMAXA.

24 hodin před transfekcí byly buňky kultivovány v médiu bez antibiotik (90% RPMI-1640, 10% FBS). Druhý den byly buňky promyty 1xPBS. 1,5x10⁶ NB4 buněk bylo smícháno s nukleofekčním roztokem a transfekováno s oligonukleotidy: 60nM MYB siRNA, 60nM p53 siRNA, 100nM mmu-miR-155 anti-miRNA inhibitorem, 0,2 μg plasmidem pEBB-PU.1, 30 nM negativní kontrolou siRNA, 100 nM negativní kontrolou anti-miRNA inhibitoru a 0,2 μg kontrolního pcDNA plasmidu (SK+). Plasmid pMAX GFP byl kotransfekován pro detekci a následnou separaci transfekovaných buněk. Pro transfekci byl použit program Y001. Okamžitě po nukleofekci byly buňky přeneseny do předeřátého kultivačního media (37°C) a inkubovány při 37°C a 5% atmosféře CO₂. GFP⁺ buňky byly odseparovány na průtokovém cytometru BD FACS Aria IIu po 96 hodinách (MYB siRNA, anti-miR-155) nebo 48 hodinách (pEBB-PU.1, p53 siRNA) pro izolaci mRNA a následnou RT-qPCR analýzu.

Kultivační detekce kolonie tvořících buněk (Mouse Colony-Forming Cell Assays) a její využití pro transientní inhibici exprese

Magneticky separované (na koloně) c-Kit⁺ buňky kostní dřeně byly transientně transfekovány oligonukleotidy a po 36 hodin (Myb siRNA) nebo 72 hodin (anti-miR-155) kultivace byly promyty IMDM médiem (2% FBS). Počet buněk v kultuře byl stanoven jejich spočítáním v Bürkreově komůrce. 10⁴ buněk/jamku bylo promícháno s 1 ml komerčně dodávaného metylcelulosového média (Methocult M3434 + 1% Penicillin/Streptomycin) na míchačce vortex, přeneseno (0,9 x 40 mm jehlou) na 6ti jamkovou destičku (kde do jedné jamky byla napipetována ddH₂O) a kultivováno po dobu 12 dní při 37°C a 5% atmosféře CO₂. Počet CFU-granulocytů, CFU-makrofágů, CFU-granulocyto-makrofágů, CFU-granulocyto-erytroido-monocyto-megakaryocytů, BFU-erytroidů a kolonií nezralých buněk byl zaznamenán, dle návodu výrobce, dvěma nezávislými výzkumníky.

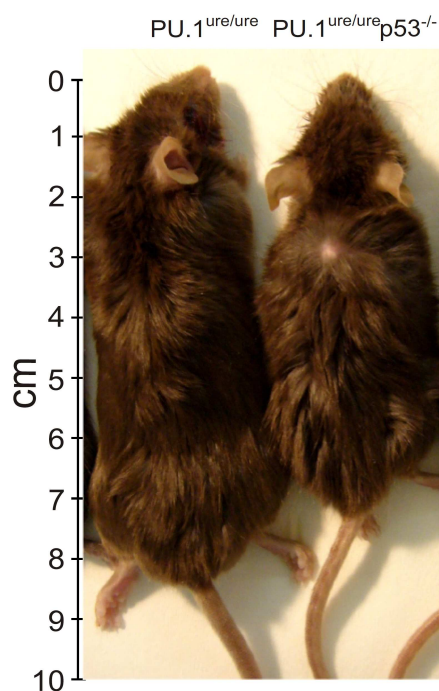
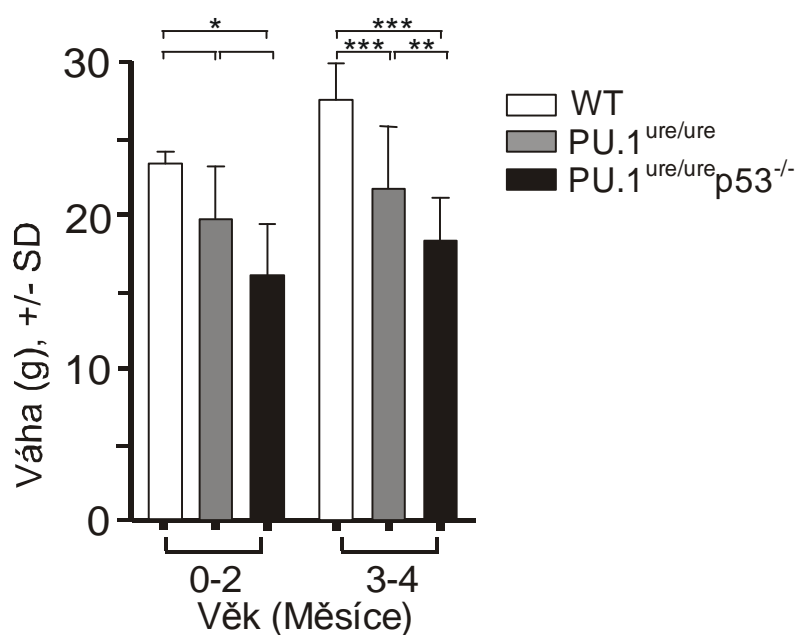
VÝSLEDKY

Myši s dvojitou mutací PU.1/p53 vyvíjejí agresivní AML

Transgenní myši PU.1^{ure/ure} byly kříženy s modelem p53^{-/-} za vytvoření nového myšího modelu PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}. Ve věku 3 měsíců byly pozorovány mezi modely PU.1^{ure/ure} a PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} výrazné změny např: váhový ubytek, letargie a nahrbenost dvojité mutantních myší (**Výsledkový obrázek 1A, 1B**). Myši PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} vážily v průměru o 30 % méně než kontrolní myši a o 15 % méně než myši PU.1^{ure/ure} (**Výsledkový obrázek 1B**). Tyto symptomy naznačovaly, že myši PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} trpí mnohem vážnějším onemocněním v porovnání s PU.1^{ure/ure}.

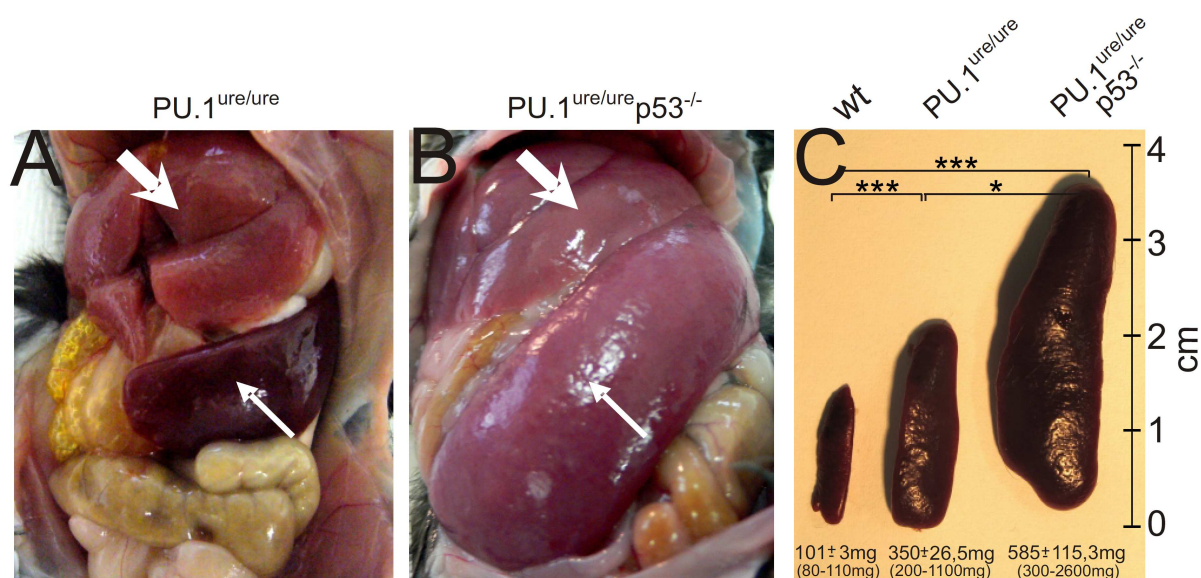
Důkladným vyšetřením břišní dutiny jsme odhalili, že myši PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} mají velmi výraznou hepatosplenomegálií (zvětšená játra a slezinu) v porovnání s myšmi PU.1^{ure/ure}, které trpí hepatosplenomegálií v mnohem menším rozsahu (**Výsledkový obrázek 2A-C**).

V dalším kroku jsme provedli histologii slezin u všech tří genotypů. Toto vyšetření ukázalo, že sleziny PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} myši jsou infiltrovány morfologicky nezralými blasty - nezralými buňkami AML. Hyperémické (překrvené) sleziny vykazovaly známky hyperplázie (zvětšení orgánu způsobené množением jednotlivých buněk). Dále bylo pozorováno, že AML myeloblasty s různorodým poměrem jadro-cytoplasma nahradily normální stavbu sleziny v obou modelech PU.1^{ure/ure} a PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} (**Výsledkový obrázek 3A-C**). Sleziny myši PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} obsahovaly navíc stopy extramedulární hematopoiezy (krvetořba probíhající mimo kostní dřeň), jednalo se o silně dysplastické megakaryocyty. Naproti tomu u slezin myši PU.1^{ure/ure} tento typ megakaryocytů nebyl vůbec pozorován (**Výsledkový obrázek 3A-C, 4A-C**). Histologická vyšetření slezin prokázala, že oba myší modely PU.1^{ure/ure} i PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} trpí hematologickým onemocněním AML, avšak myši PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} mají agresivnější typ s některými dysplastickými rysy.

A**B**

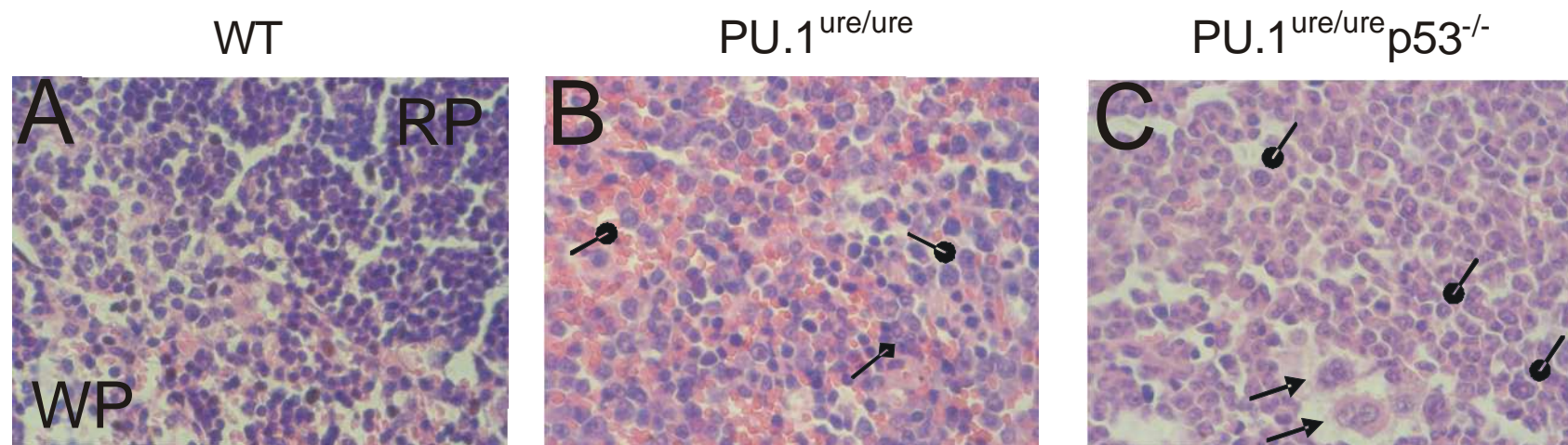
Výsledkový obrázek 1: Agresivní AML u PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} myší.

(A) Myši, daného genotypu ve věku 3 měsíců. Znatelný váhový ubytok a nahrbenost u myší PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}. (B) Průměrná váha ± SD myší PU.1^{ure/ure} (N=65), PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} (N=38) a kontrolních myší (N=38) rozdělených dle věku (osa X). *P*-hodnoty (*t*-test, nepárový): * ≤ 0,05; ** ≤ 0,001; *** ≤ 0,0001.



Výsledkový obrázek 2: Hepatosplenomegálie u myší s AML.

(A-B) Břišní dutina myší $PU.1^{ure/ure}$ a $PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}$ s AML v pátém (vlevo) a třetím (vpravo) měsíci. Znázorněno zvětšení jater (tučná šipka) a sleziny (tenká šipka). (C) *Ex vivo* izolované sleziny (průměrná váha ± SEM) myší $PU.1^{ure/ure}$ (N=65), $PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}$ (N=35) a myší kontrolních (N=32).



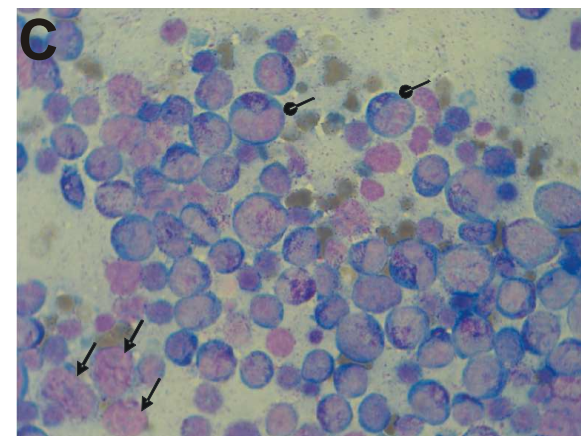
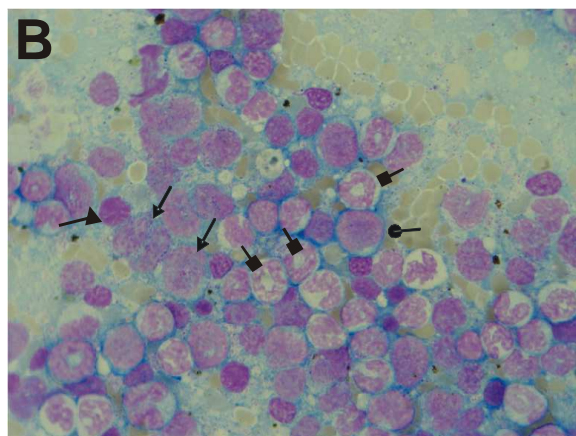
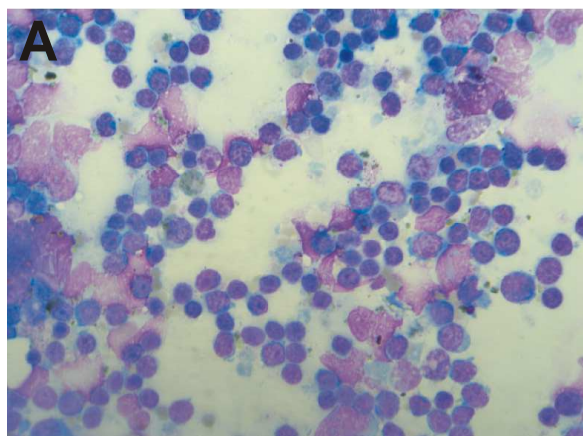
Výsledkový obrázek 3: Histologie slezin myší s AML.

(A-C) Histologie slezin v parafínovém bločku kontrolních myší (A), PU.1^{ure/ure} (B) PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} (C), ~7-8 μ m tenké řezy, barveno hematoxylin/eosin (zvětšení: 1000x). Parenchym slezin kontrolních myší má normální stavbu, zřetelně rozdělenou na červenou a bílou pulpu (RP, WP). Meloblasty (jsou značeny kroužky) nahrazují RP a WP (B-C), dysplastické megakaryocyty (šipkami) (C), lymfocyty (kosočtverci) (B).

WT

PU.1^{ure/ure}

PU.1^{ure/ure} p53^{-/-}



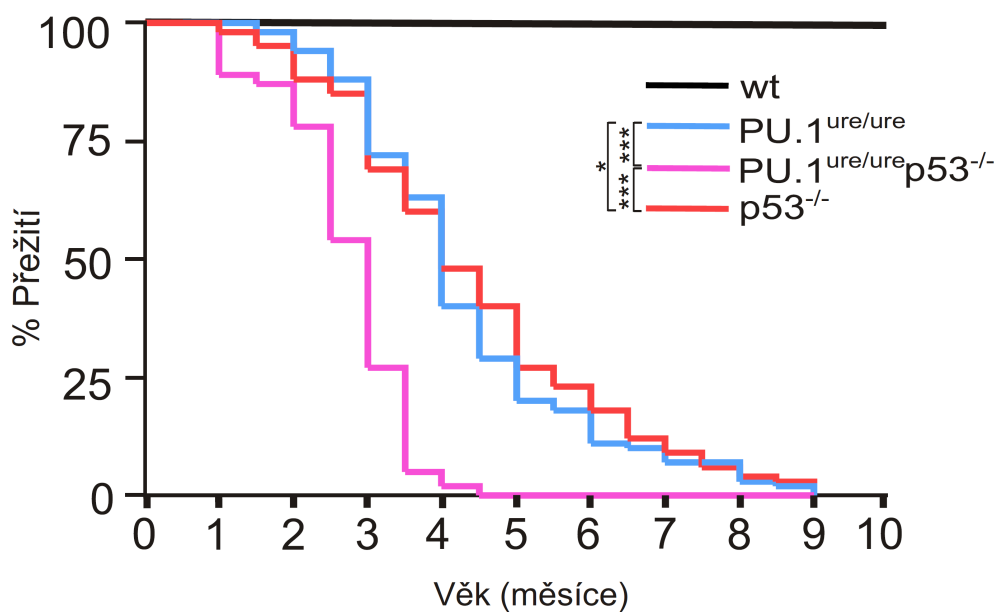
Výsledkový obrázek 4: Cytologie slezin myší s AML.

Cytologie slezin kontrolních myší (A), PU.1^{ure/ure} (B) PU.1^{ure/ure} p53^{-/-} (C), barveno hematoxylin/eosin (zvětšení: 100x). Myeloblasty jsou značeny kroužky, dysplastické megakaryocyty šipkami, plasmocyty trojuhelníky, neutrofilní granulocyty čtverci.

Na základě monitorování celkového přežívání myší (**Výsledkový obrázek 5 a Výsledková tabulka 1**), bylo prokázáno, že myši PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} umíraly signifikantně dříve než myši PU.1^{ure/ure} nebo p53^{-/-}. Myši PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} se dožívaly maximálního věku 4 měsíců (median ~3 měsíce), zatímco myši PU.1^{ure/ure} a p53^{-/-} až 9 měsíců. U myší PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} (3 případy z 38) se nevyskytovaly v porovnání s modelem p53^{-/-} (19 případů ze 40) solidní tumory (**Výsledková tabulka 2**).

U postižených myší jsme udělali krevní rozpočet z periferní krve (**Výsledkový obrázek 6**) a zjistili jsme, že myši PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} mají výrazně nižší počet zralých červených krvinek (což se projevuje zároveň nižším celkovým hemoglobinem a hematokritem), stejně tak nižším počtem krevních destiček.

Průtokovou cytometrií (Rosenbauer et al., 2004) kostní dřeň bylo potvrzeno, že jak model PU.1^{ure/ure} tak i model PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} mají podobný expresní profil povrchových molekul Mac1, c-Kit a Gr-1, neboli že myši s dvojitou mutací trpí stejným typem AML jako model PU.1^{ure/ure}. AML fenotyp byl charakterizován akumulací c-Kit⁺Mac-1^{low}Gr-1⁺ buněk. Přítomnost c-Kit antigenu na většině Mac-1 a Gr-1 pozitivních buňkách ukazuje na nadbytek myeloidních buněk nezralého fenotypu. Nejvýznamnější rozdíl jsme pozorovali v tom, že AML fenotyp se vytváří u PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} myší mnohem dříve (již ve 3 měsíci) ve srovnání s PU.1^{ure/ure} modelem (až v 6 měsíci) (**Výsledkový obrázek 7**). Preleukemická fáze, typická pro PU.1^{ure/ure} myši, nebyla u myší s dvojitou mutací nikdy zachycena (**Výsledkový obrázek 7 a Výledková tabulka 1 a 2**). Z hlediska povrchových molekul jsme pozorovali pouze malé odlišnosti mezi oběma modely jako např: slabý nárůst Mac1⁺Gr-1⁺ blastů v periferní krvi (**Výsledkový obrázek 8C**) a výrazná lymfopénie v kostní dřeni (**Výsledkový obrázek 8E**) i v periferní krvi (**Výsledkový obrázek 8F**) u modelu PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}.



Výsledkový obrázek 5: Kaplan-Meierova křivka přežití myši.

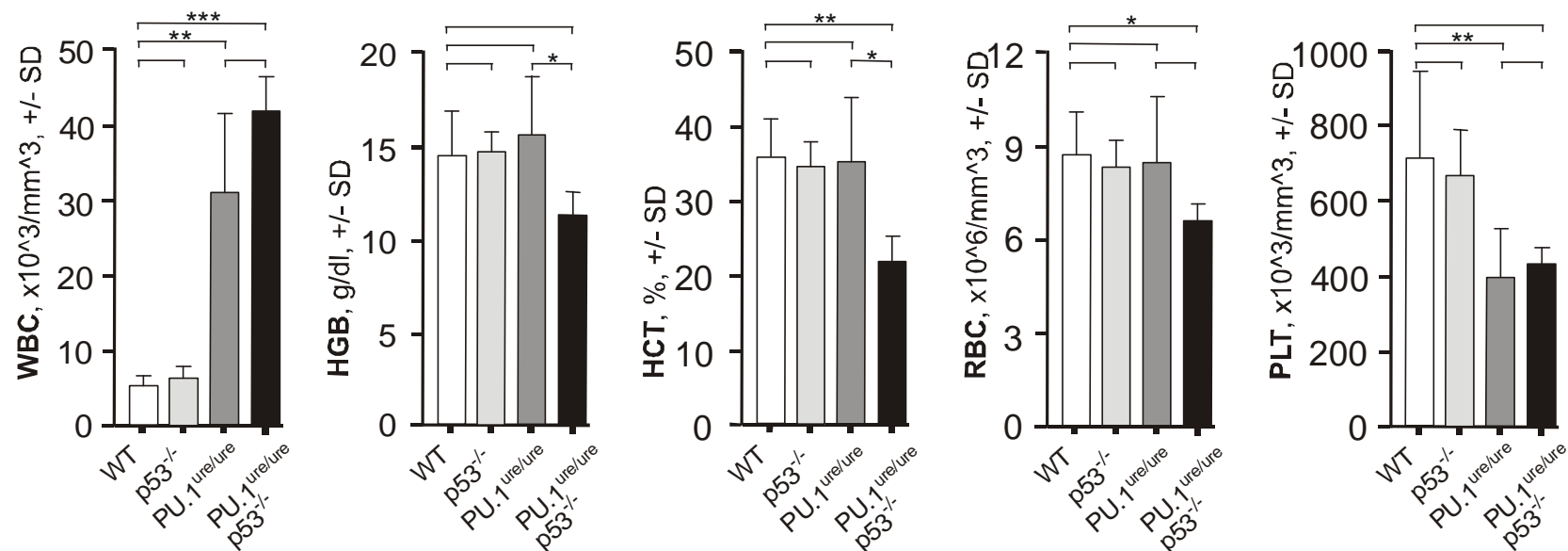
Přežití vybraných genetických typů bylo monitorováno po dobu 10 měsíců (PU.1^{ure/ure} (N=85) (modrá křivka), PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} (N=39) (růžová křivka), p53^{-/-} (N=66) (červená křivka) a wt (N=20) (černá křivka)). Myši byly usmrceny, když byly viditelně a smrtelně nemocné. U kontrolních myši nebyly pozorovány žádné známky onemocnění ve stanovené době sledování. *P*-hodnoty (One-way, ANOVA, Kruska-Wallis): * ≤ 0,05; ** ≤ 0,001; *** ≤ 0,0001.

Výsledková tabulka 1: Frekvence vývoje AML u myší PU.1^{ure/ure} a PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} během 6 měsíců

Frekvence		
Věk (měsíce)	PU.1 ^{ure/ure}	PU.1 ^{ure/ure} p53 ^{-/-}
1-2	0 %	100 % AML
2,5-3,5	100 % preleukemie	90 % AML
4-5,5	100 % AML	100 % AML

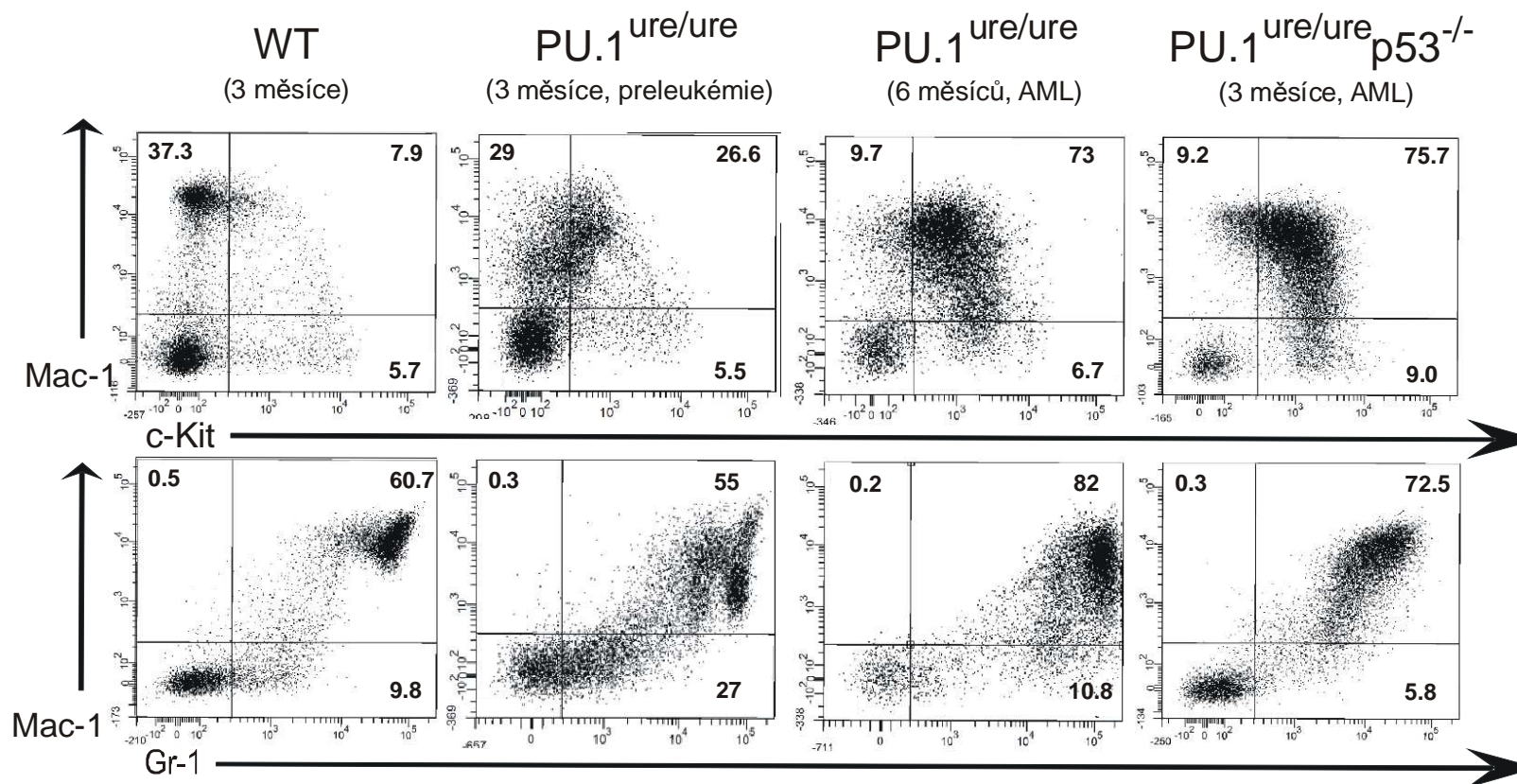
Výsledková tabulka 2: Frekvence vývoje preleukemie, AML a nádorových útvarů u myší PU.1^{ure/ure}, p53^{-/-} a PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}.

Frekvence			
	PU.1 ^{ure/ure}	p53 ^{-/-}	PU.1 ^{ure/ure} p53 ^{-/-}
preleukemie	10/115	0/40	0/38
AML	105/115	0/40	38/38
Nádory	0/115	19/40	3/38



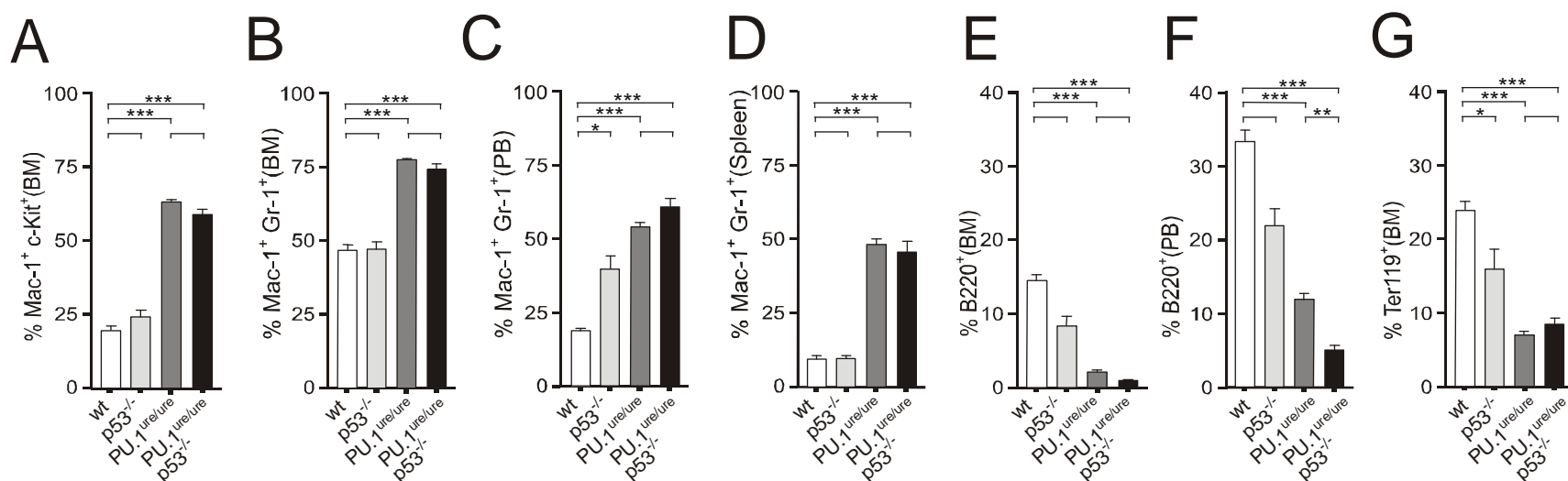
Výsledkový obrázek 6: Krevní obraz: bílé, červené a destičkové řady.

Krevní rozpočet z periférní krve a příslušné jednotky jsou vyznačeny na ose y. WBC – bílé krvinky, HGB – hemoglobin, HCT – hematokrit, RBC – červené krvinky, PLT – krevní destičky. Ve věku 3 měsíců byl na hemoanalyzeru změřen krevní rozpočet u všech 3 genotypů a kontrolních myší (PU.1^{ure/ure} (N=10), PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} (N=6), p53^{-/-} (N=6) a wt (N=8). Průměrná hodnota krevního rozpočtu +/- SD, *P*-hodnoty (One-way, ANOVA, Kruskal-Wallis): * ≤ 0,05; ** ≤ 0,001; *** ≤ 0,0001.



Výsledkový obrázek 7: Analýza AML metodou průtokové cytometrie.

Analýza kostní dřeně pomocí průtokové cytometrie na povrchové molekuly Mac-1 (osa y), Gr-1 a c-Kit (oba na ose x). Genotypy a věk studovaných zvířat jsou vyznačeny nad obrázky. Přítomnost dvojité pozitivní c-Kit⁺Mac-1⁺ myeloidních buněk reprezentuje nezralý AML fenotyp neoplastických mutantních myši. Čísla v kvadrantech bodového grafu znázorňují procento ze všech buněk.

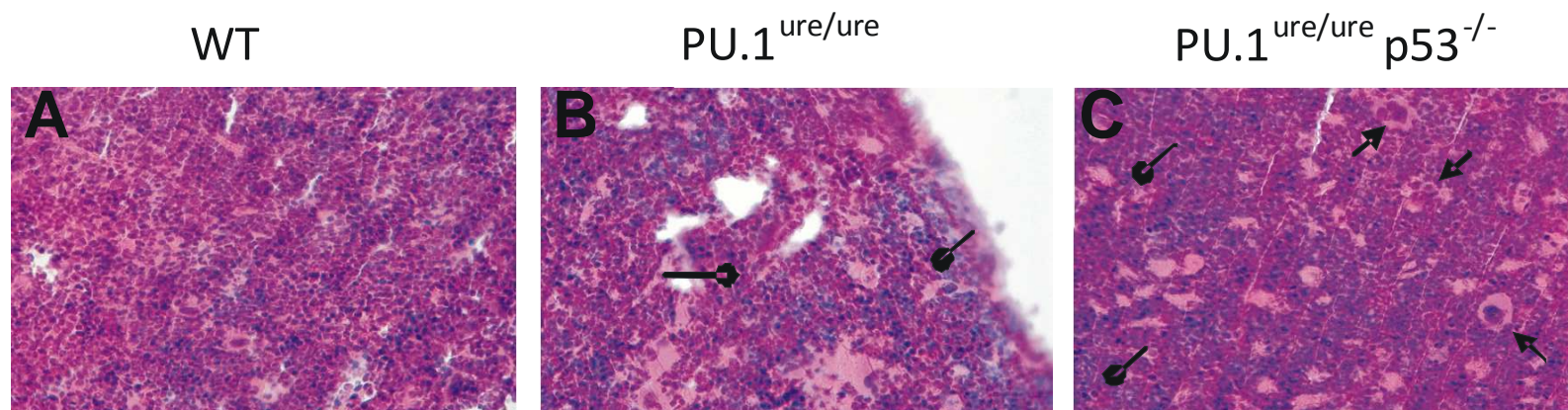


Výsledkový obrázek 8: Analýza povrchových znaků AML.

Analýza kostní dřeně, periférní krve a sleziny pomocí průtokové cytometrie na povrchové molekuly Mac-1, Gr-1, c-Kit, B220 a Ter119 (osa y). Genotypy jsou vyznačeny na ose x. (wt (N=20), p53^{-/-} (N=40), PU.1^{ure/ure} (N=115), PU.1^{ure/ure} p53^{-/-} (N=38)). Průměrná hodnota \pm SEM, *P*-hodnoty (One-way, ANOVA, Kruska-Wallis): * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,001$; *** $\leq 0,0001$. **(A)** Procento Mac-1⁺c-Kit⁺ nezralých buněk v kostní dřeni. **(B-D)** Procento Mac-1⁺Gr-1⁺ buněk v kostní dřeni **(B)**, periférní krvi **(C)**, slezině **(D)**, **(E-F)** Procento B220⁺ buněk v kostní dřeni **(E)**, periférní krvi **(F)**, a taktéž procento Ter119⁺ buněk v kostní dřeni **(G)**.

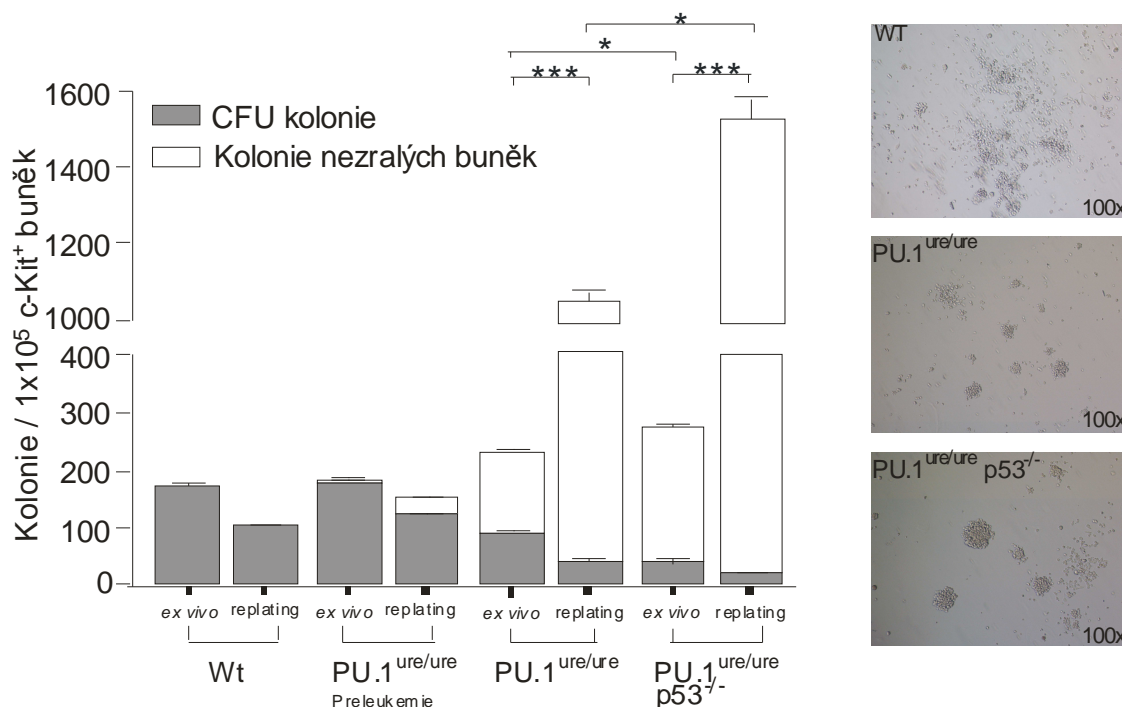
Histologické vyšetření kostní dřeně ukázalo, že podobně jako v případě slezin, nezralé AML blasty vyplňují téměř celou kostní dřeň u obou typů myší PU.1^{ure/ure} a PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} (**Výsledkový obrázek 9**). Taktéž byly v kostní dřeni PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} myší pozorovány časté dysplastické rysy v megakaryocytech (**Výsledkový obrázek 9C**), což koresponduje s histologickým nálezem ve slezinách u agresivního typu AML.

Biologické vlastnosti obou typů AML odvozených z myší PU.1^{ure/ure} a PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} jsme otestovali kultivací magneticky separovaných c-Kit⁺ buněk v semisolidním mediu s růstovými faktory, jež podporují růst myeloidních a erytroidních kolonií. Zatímco buňky kontrolních myší (WT) tvoří CFU kolonie progenitorů, leukemické buňky obou genotypů tvoří převážně kolonie nezralých buněk (**Výsledkový obrázek 10**). Zajímavé je, že kolonie nezralých buněk z myší PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} byly pozoruhodně větší což odpovídá i jejich zvýšené proliferaci. Následně po přenesení semisolidní kultury na nové metylcelulózové médium (replating) se počet kolonií nezralých buněk PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} ve srovnání s PU.1^{ure/ure} významně zvýšil (**Výsledkový obrázek 10**). Preleukemické progenitory izolované ve věku 3 měsíců z myší PU.1^{ure/ure} vytvářejí srovnatelný (s WT) počet kolonií CFU a nevelký počet kolonií nezralých buněk, který však vzrostl po přenesení na nové metylcelulózové médium (replating assay) (**Výsledkový obrázek 10**).



Výsledkový obrázek 9. Histologie kostní dřeně ukazuje infiltraci s AML.

(A-C) Histologie slezin v parafínovém bločku kontrolních myší (A), PU.1^{ure/ure} (B) PU.1^{ure/ure} p53^{-/-} (C), ~7-8 μ m tenké řezy, barveno hematoxylin/eosin (zvětšení: 400x). Meloblasty jsou značeny (kroužky) (B-C) a časté dysplastické megakaryocyty (šipkami) (C).



Výsledkový obrázek 10: Biologické vlastnosti AML u myší PU.1^{ure/ure} a PU.1^{ure/ure} p53^{-/-} pomocí tzv. “replating assay”.

Počty (vlevo) a fotografie (vpravo) semisolidních kolonií CFU a kolonií nezralých buněk (daného genotypu, izolovaných z myší PU.1^{ure/ure} (věk 6 měsíců) a PU.1^{ure/ure} p53^{-/-} (věk 3 měsíce), které vznikly z c-Kit⁺ buněk po 5-7 dnech (*ex vivo*) a po přenesení semisolidní kultury („replating“) na nové metylcelulózové médium. Průměrná hodnota počtu kolonií +/- SEM, *P*-hodnoty (*t*-test, nepárový, pro kolonie nezralých buněk): * ≤ 0,05; ** ≤ 0,001; *** ≤ 0,0001.

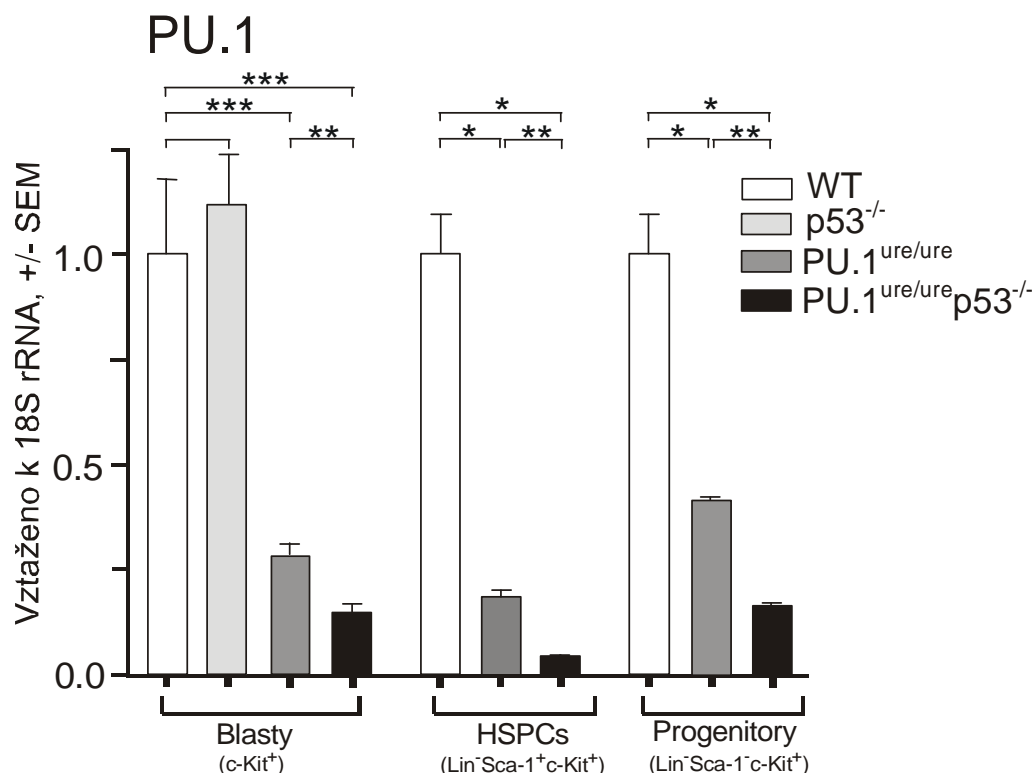
Snížená hladina exprese PU.1 a deregulace miR-155 u myší

PU.1^{ure/ure} a PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} s AML

Z údajů získaných z průtokové cytometrie a histologie jsme prokázali, že myší model PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} vyvíjí mnohem agresivnější typ AML onemocnění s dysplastickými rysy a po všech stránkách s horšími symptomy a kratší dobou přežití v porovnání s modely PU.1^{ure/ure} nebo p53^{-/-}. Typ AML z hlediska povrchových molekul je totožný, ale biologické vlastnosti v semisolidní kultuře jsou odlišné.

Expresní hladina PU.1 je rozhodujícím faktorem pro hematopoetickou diferenciaci a její snížení na 20% způsobuje u myší PU.1^{ure/ure} AML onemocnění (Rosenbauer et al., 2004). **Proto jsme si položili otázku, je hladina exprese PU.1 v c-Kit⁺ blastech PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} stejná nebo nižší než u blastů PU.1^{ure/ure}?** Nejprve jsme určili expresi mRNA transkriptu PU.1 v nádorových buňkách pro všechny genotypy. V myším modelu p53^{-/-} byla hladina PU.1 v magneticky separovaných blastech (c-Kit⁺ populace nezralých buněk) exprimována na podobné úrovni jako v kontrolním modelu wt, zatímco v modelu PU.1^{ure/ure} byla hladina PU.1 snížena přibližně na 20% v porovnání s wt. Toto pozorování naznačuje, že pouze samotná ztráta p53 neovlivní expresi PU.1. Zjistili jsme, že exprese PU.1 se ještě více sníží (na přibližně 10 % v porovnání s WT, tedy zhruba dvakrát oproti PU.1^{ure/ure} AML) v modelu PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} (**Výsledkový obrázek 11**). Dále jsme změřili hladinu PU.1 v populaci c-Kit⁺Sca-1⁺lin⁻ hematopoetických kmenových a progenitorových buňkách (HSPCs) a v c-Kit⁺Sca-1⁺lin⁻ progenitorech izolovaných pomocí průtokové cytometrie. Populace HSPCs a progenitorů byly zastoupeny v myších PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} 4-5krát méně (v porovnání s PU.1^{ure/ure}). mRNA exprese PU.1 v populaci HSPCs z myší PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} je 2-3krát nižší ve srovnání se stejnými buňkami izolovanými z myší PU.1^{ure/ure}. Podobná data byla získána i z populace c-Kit⁺Sca-1⁺lin⁻ progenitorů (**Výsledkový obrázek 11**).

Získané údaje o snížené hladině PU.1 na úrovni transkripce nás vedly k otázce, zda dochází k snížení hladiny PU.1 i na proteinové úrovni. Hladinu proteinu PU.1 jsme změřili pomocí metody intracelulární průtokové cytometrie (Noel et al., 2012). Podobně



Výsledkový obrázek 11: Analýza exprese mRNA transkriptu PU.1 v nezralých myeloidních buňkách u AML.

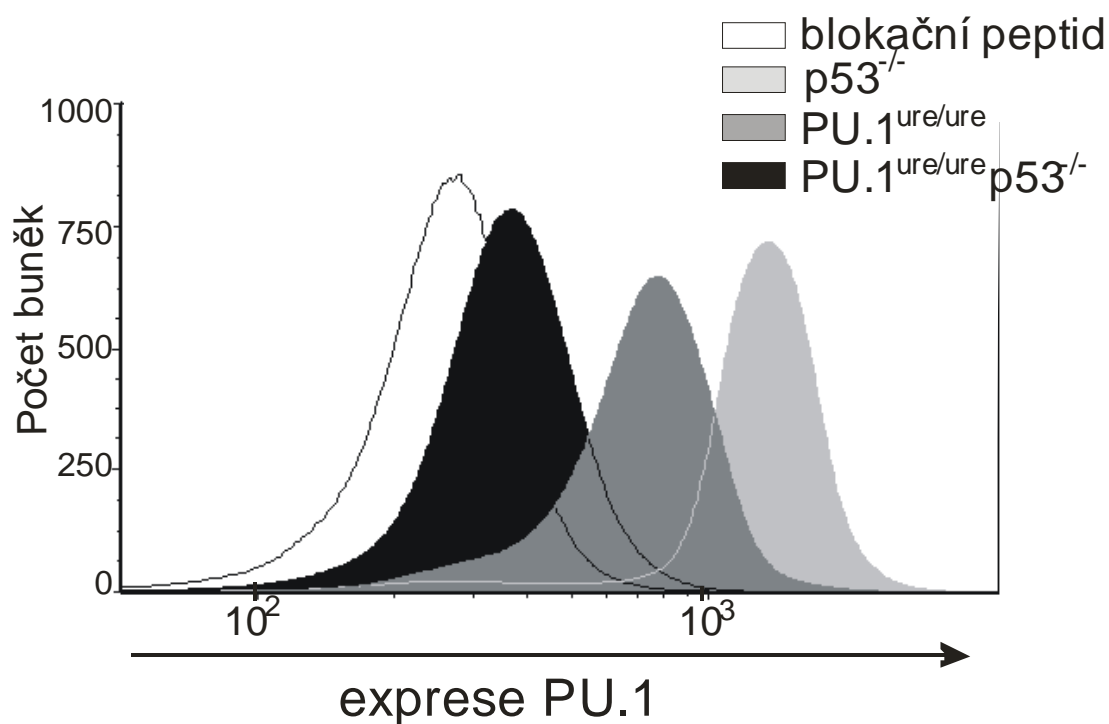
Expres mRNA transkriptu PU.1 stanovena pomocí TaqMan qPCR v c-Kit⁺ buňkách kostní dřeně všech značených genotypů (wt (N=12), p53^{-/-} (N=28), PU.1^{ure/ure} (N=75), PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} (N=24)), HSPCs a progenitorech kostní dřeně (wt (N=2), PU.1^{ure/ure} (N=2), PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} (N=2)). Na ose y je znázorněna relativní hladina mRNA exprese PU.1 vztažená k referenčnímu genu 18S, kontrolní set byl roven 1. Chybové úsečky u jednotlivých sloupců zobrazují velikost standardní chyby pro nezávislé experimenty. *P*-hodnota (One-way, ANOVA, Kruska-Wallis): * ≤ 0,05; ** ≤ 0,001; *** ≤ 0,0001.

jako na úrovni RNA, tak i na proteinové úrovni je hladina PU.1 v $p53^{-/-}$ c-Kit⁺ progenitorech srovnatelná s hladinou v kontrolních myších WT. V progenitorech PU.1^{ure/ure} myší byla hladina proteinu PU.1 snížena v porovnání s blasty WT a $p53^{-/-}$. Ještě výraznější snížení hladiny proteinu PU.1 jsme detekovali v blastech PU.1^{ure/ure} $p53^{-/-}$ (**Výsledkový obrázek 12**). Hladina PU.1 (jak mRNA, tak proteinu) je snížena v populaci Mac-1⁺c-Kit⁺ buněk v agresivní AML vyvinuté v myších PU.1^{ure/ure} $p53^{-/-}$ v porovnání s toutéž populací v AML z myší PU.1^{ure/ure}.

Jak již bylo zmíněno, progenitory myší $p53^{-/-}$ exprimují stejnou hladinu PU.1 (jak mRNA, tak proteinu) jako progenitory kontrolních wt myší. Navzdory tomu, že se p53 může vázat na DNA jako transkripční faktor, nereguluje pravděpodobně hladinu PU.1 přímo. Bylo potvrzeno, že výrazné snížení exprese PU.1 v progenitorech myší PU.1^{ure/ure} $p53^{-/-}$ bylo jak následkem delece URE oblasti tak i nepřítomností p53.

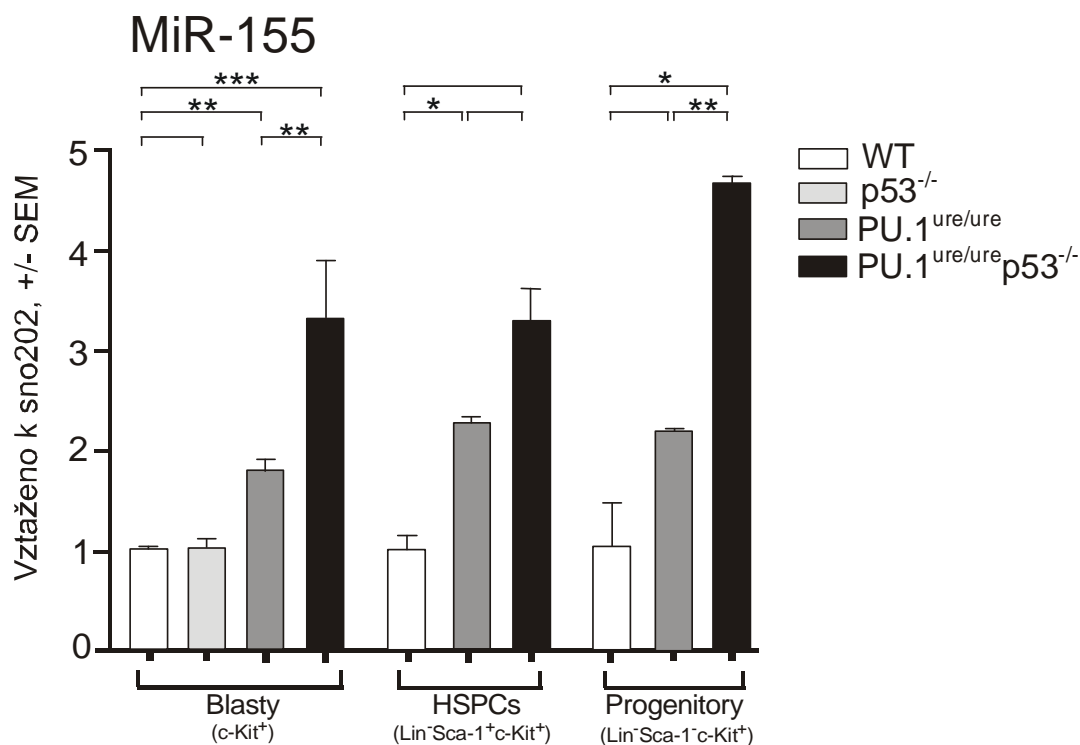
miR-155 představuje klíčový faktor ovlivňující posttranskripční snížení PU.1. Zvýšená exprese miR-155 v myší způsobuje myeloproliferativní nemoc (O'Connell et al., 2008). Předpokládali jsme, že miR-155 by mohl být odpovědný za inhibici PU.1 ve studovaných AML modelech. **Položili jsme si proto otázku, je tento klíčový regulátor (miR-155) exprese PU.1 v uvedených AML modelech narušen?** Zjistili jsme, že je miR-155 významně zvýšen v c-Kit⁺ progenitorech izolovaných z kostní dřeně myší PU.1^{ure/ure} (**Výsledkový obrázek 13**). Mimoto došlo k ještě výraznějšímu zvýšení hladiny miR-155 (> tříkrát ve srovnání s WT) v PU.1^{ure/ure} $p53^{-/-}$ myších, která je signifikantně vyšší než v PU.1^{ure/ure}. Zvýšená hladina miR-155 byla rovněž prokázána v populaci progenitorů a HSPCs příslušných genotypů (**Výsledkový obrázek 13**).

Dále jsme si položili otázku, zda je zvýšení hladiny miR-155 v AML regulováno na epigenetické úrovni. Metodou chromatinové imunoprecipitace (ChIP) jsme provedli detailní analýzu zaměřenou na histonové modifikace v oblasti *Mir155hg* za použití protilátky proti modifikacím histonu H3: H3K9Ac, H3K9Me3 a H3K4Me3. Pozorovali jsme výrazné chromatinové změny u c-Kit⁺ nezralých buněk myší PU.1^{ure/ure} $p53^{-/-}$ a myší PU.1^{ure/ure} vs kontroly. Byla signifikantně detekována značka



Výsledkový obrázek 12: Analýza hladiny proteinu PU.1 v AML.

Analýza hladiny proteinu PU.1 v Mac1⁺c-Kit⁺ buňkách všech genotypů pomocí průtokové cytometrie. Jako kontrola byl použit blokační peptid, který obsahuje vazebné epitopy rozeznávané specifickou protilátkou vůči PU.1. Reprezentativní experiment (N=2), na ose x je znázorněna exprese PU.1, na ose y počet buněk (suspense jednotlivých buněk “singletů”).

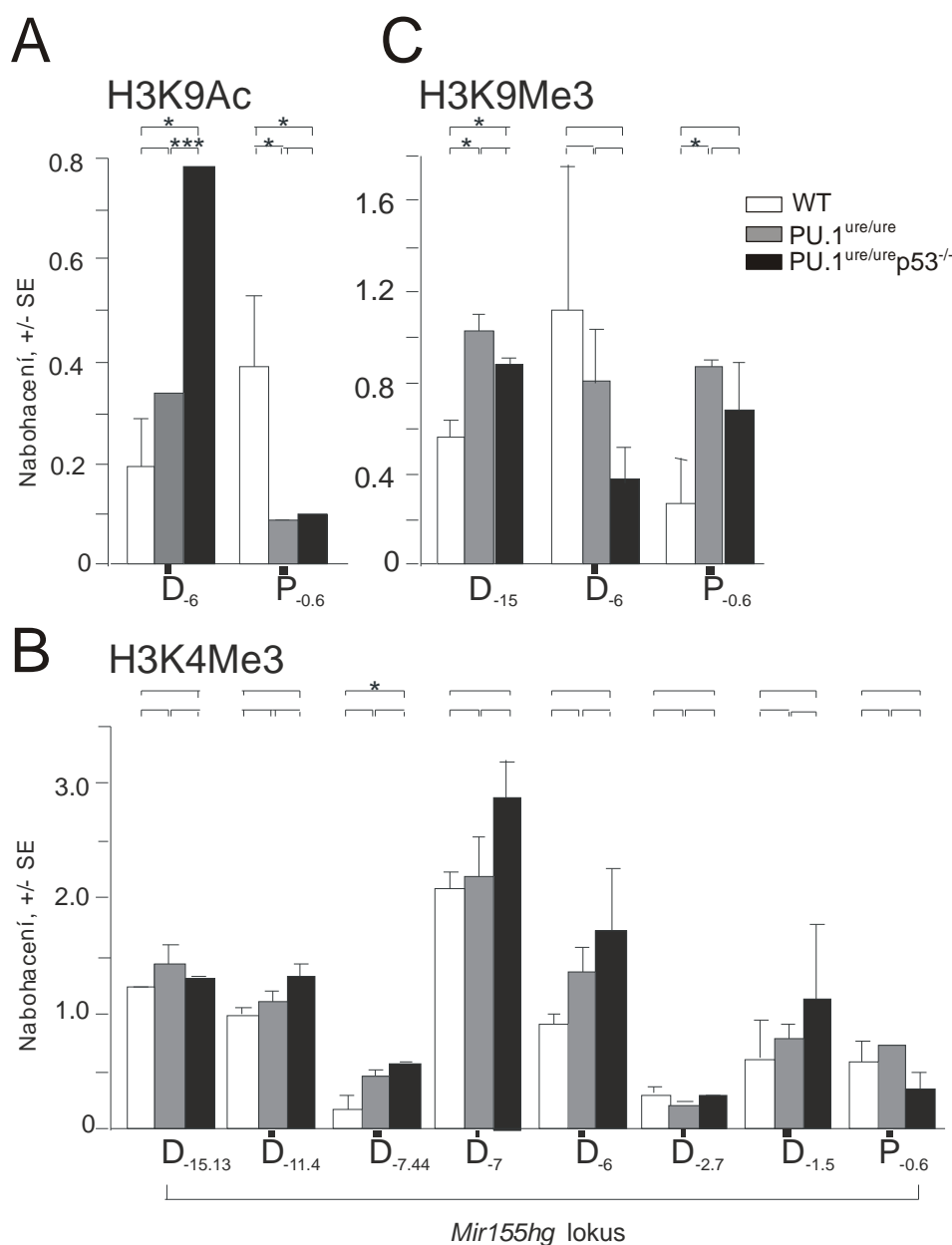


Výsledkový obrázek 13: Analýza exprese transkriptu miR-155 v AML.

Expres transkriptu miR-155 stanovena pomocí TaqMan qPCR v c-Kit⁺ buňkách kostní dřeně všech značených genotypů (wt (N=12), p53^{-/-} (N=28), PU.1^{ure/ure} (N=75), PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} (N=24)), HSPCs a progenitorech kostní dřeně (wt (N=2), PU.1^{ure/ure} (N=2), PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} (N=2)). Na ose y je znázorněna relativní hladina exprese miR-155 vztažená k referenčnímu genu sno202, kontrolní set byl roven 1. Chybové úsečky u jednotlivých sloupců zobrazují velikost standardní chyby pro nezávislé experimenty. *P*-hodnota (*t*-test, nepárový): (* ≤ 0,05; ** ≤ 0,001; *** ≤ 0,0001).

aktivního chromatinu, histon H3K9 acetylace, v distální regulační oblasti (v blízkosti -6 kb, D-6, **Výsledkový obrázek 14A**), zatímco opačný efekt byl zaznamenán na proximálním promotoru (v blízkosti -0,6 kb, P-0,6, **Výsledkový obrázek 14A**). V distální oblasti D-6 (spolu s D-7 a D-1,5) byla také nabohacena aktivační značka histonu H3K4 trimetylce (**Výsledkový obrázek 14B**). Aktivní značky v amplikonech D-6 a P-0,6 byly reflektovány opačným stavem represivní značky, H3K9 trimetylce (**Výsledkový obrázek 14C**). Předchozí studie uvádějí, že PU.1 se u vývíjejících se myeloidních progenitorů váže do oblasti v blízkosti -15kb (D-15), dočasně ji aktivuje a následně umožní inhibici transkripce *Mir155hg* lokusu (Ghani et al., 2011). Represivní značka H3K9Me3 je nabohacena (v oblasti D-15) u obou myších modelů PU.1^{ure/ure} i PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} (**Výsledkový obrázek 14B**). Toto nabohacení naznačuje, že došlo k narušení regulační smyčky mezi PU.1 a miR-155, jež byla pozorováno v normálních progenitorových buňkách (Ghani et al., 2011). PU.1 nemůže kontrolovat tuto oblast při vývoji AML onemocnění (nízká hladina PU.1). Analýza histonových modifikací prokázala aktivně transkribovaný chromatin na lokusu *Mir155hg* v c-Kit⁺ nezralých buňkách PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}. To znamená, že transkripční regulace miR-155 je asociovaná s epigenetickými známkami genové aktivace vedoucí k větší expresi miR-155 u PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} myší.

Tyto výsledky naznačují, že v c-Kit⁺ progenitorech u myší PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} dochází, ve srovnání s progenitory získaných z myší PU.1^{ure/ure}, k výraznému snížení exprese PU.1 a současně k výraznému zvýšení hladiny miR-155. V důsledku toho dochází k porušení regulace aktivity chromatinové struktury v progenitorech u AML v myších PU.1^{ure/ure} a ve větší míře v progenitorech myší PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} vedoucí k dalšímu snížení hladiny exprese PU.1.



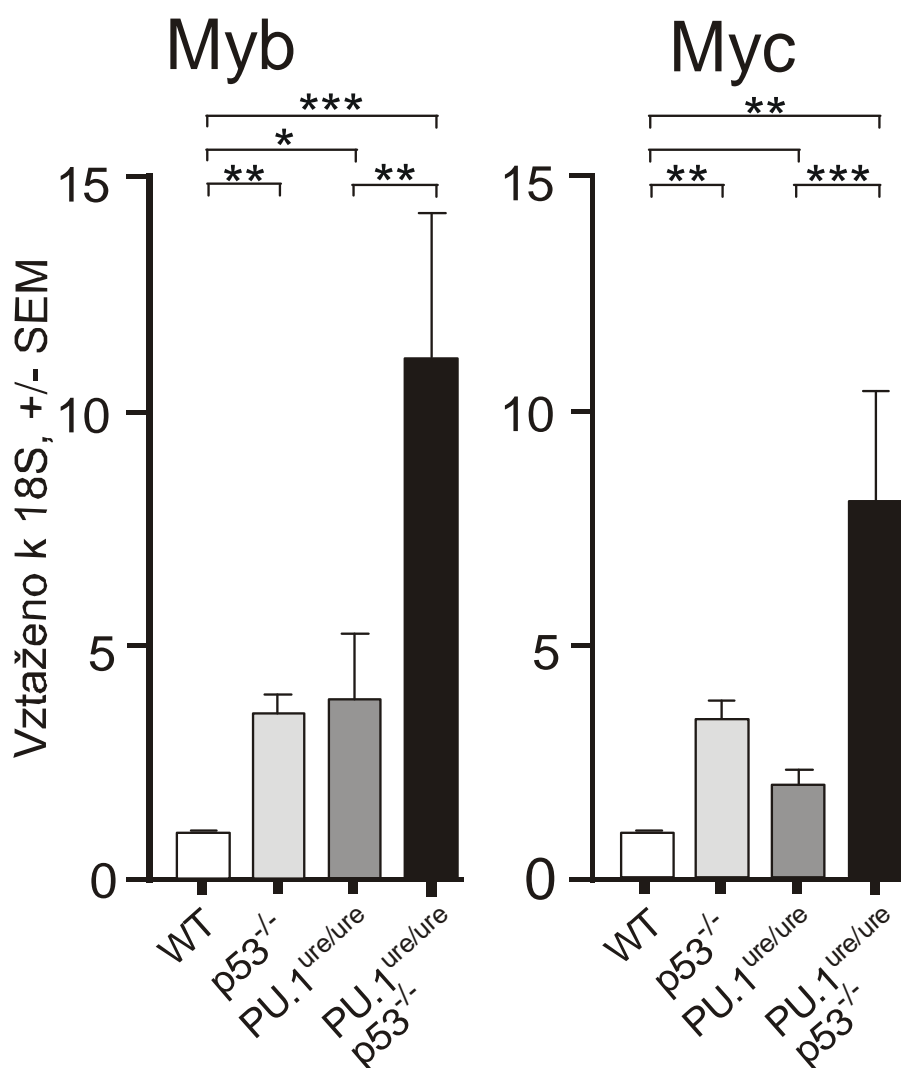
Výsledkový obrázek 14: Analýza histonových modifikací na lokusu *MIR155HG*.

Analýza přítomnosti určitých modifikací histonu H3 asociujících s transkripčně aktivním chromatinem ((A) H3K9Ac, (B) H3K4Me3 a s transkripčně represivním chromatinem (C) H3K9Me3) v c-Kit⁺ nezralých buňkách barevně označených genotypů. Analýza byla provedena metodou ChIP na lokusu *MIR155HG* (pozice ampikonů je vztažena k TSS, distální ~ -6kb (D) a proximalní ~ -0.6kb (P)), který je popsán na ose x. Nabohacení zobrazené na ose y ukazuje relativní přítomnost příslušných modifikací histonu H3 se zobrazenou standardní chybou vypočítanou pro dva nezávislé experimenty. *P*-hodnota (*t*-test, nepárový): * ≤ 0,05; ** ≤ 0,001; *** ≤ 0,0001.

Onkogeny Myb a Myc jsou deregulovány v leukemických buňkách myší PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}

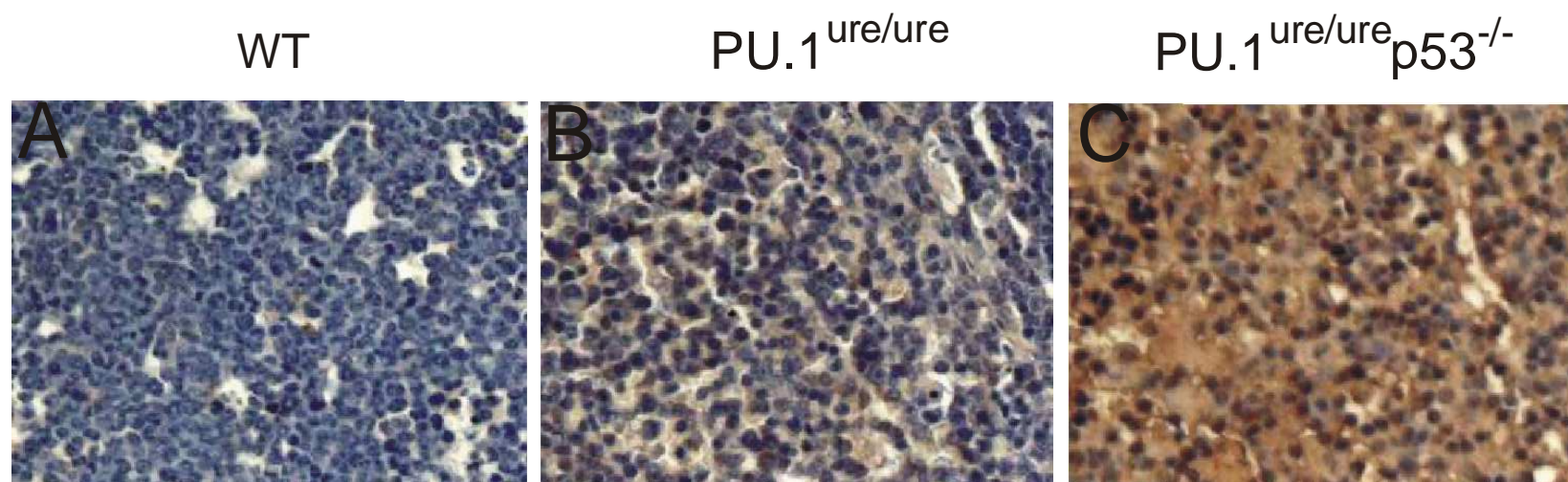
Pozorované snížení hladiny PU.1 a současné zvýšení hladiny miR-155 indikuje, že PU.1 je přímým cílem miR-155 (O'Connell et al., 2008). **Položili jsme si otázku, jaké mechanismy vedou k deregulaci miR-155?** Bylo popsáno, že E-box transkripční faktory MYB a MYC se účastní transkripční regulace miR-155 (Neiman et al., 2008; Vargova et al., 2011). V souladu s těmito pozorováními byly tyto dva onkogeny zvýšeny na úrovni mRNA u c-Kit⁺ progenitorů v myších p53^{-/-} (**Výsledkový obrázek 15**), aniž by došlo k stimulaci exprese miR-155 a rozvoji AML onemocnění (**Výsledkový obrázek 13**). Dále, hladiny Myb a ve snížené míře také Myc, jsou zvýšené u c-Kit⁺ progenitorů v myších PU.1^{ure/ure}. Zjistili jsme, že zvýšení hladiny Myb je u obou jednotlivých mutantů (p53^{-/-} nebo PU.1^{ure/ure}) na podobné úrovni. Oproti očekávání, hladina mRNA onkogenu Myb (stejně jako Myc) dále výrazně vzrostla u kombinovaného mutantu (PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}) ve srovnání s PU.1^{ure/ure} nebo WT (**Výsledkový obrázek 15**). Exprese Myb byla rovnoměrně zvýšená u většiny leukemických blastů u myší PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} (**Výsledkový obrázek 16**), jak dokazuje imunohistochemické vyšetření sleziny. Zvýšená hladina Myb byla potvrzena v AML i na proteinové úrovni.

Data naznačují, že změna v regulaci onkogenů Myb a Myc je mnohem větší v kombinovaném modelu než v modelech jednotlivých p53^{-/-} a PU.1^{ure/ure}, což vede k další změně regulace miR-155 a snížení exprese PU.1 ve které, ztráta p53, nepřímo umocňuje potlačení PU.1 během vývoje AML.



Výsledkový obrázek 15: Expres transkriptu Myb a Myc v AML.

Expres mRNA onkogenů Myb a Myc stanovena pomocí TaqMan PCR v c-Kit⁺ buňkách kostní dřeně všech značených genotypů (wt (N=12), p53^{-/-} (N=28), PU.1^{ure/ure} (N=75), PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} (N=24)), Na ose y je znázorněna relativní hladina mRNA exprese Myb nebo Myc vztažená k referenčnímu genu 18S, kontrolní set byl roven 1. Chybové úsečky u jednotlivých sloupců zobrazují velikost standardní chyby pro nezávislé experimenty. *P*-hodnota (*t*-test, nepárový): * ≤ 0,05; ** ≤ 0,001; *** ≤ 0,0001.



Výsledkový obrázek 16: Exprese Myb ve slezinách pomocí AHC.

Immunohistochemie slezin (zvětšení 200x) daných genotypů za použití protilátky anti-Myb, vizualizace byla provedena pomocí DAB peroxidasou. Zvýšená hladina Myb byla detekována v obou mutantních genotypch (**B**) a (**C**). Kontrolní vzorek (**A**) je porovnatelný s pozadím v nepřítomnosti primární protilátky.

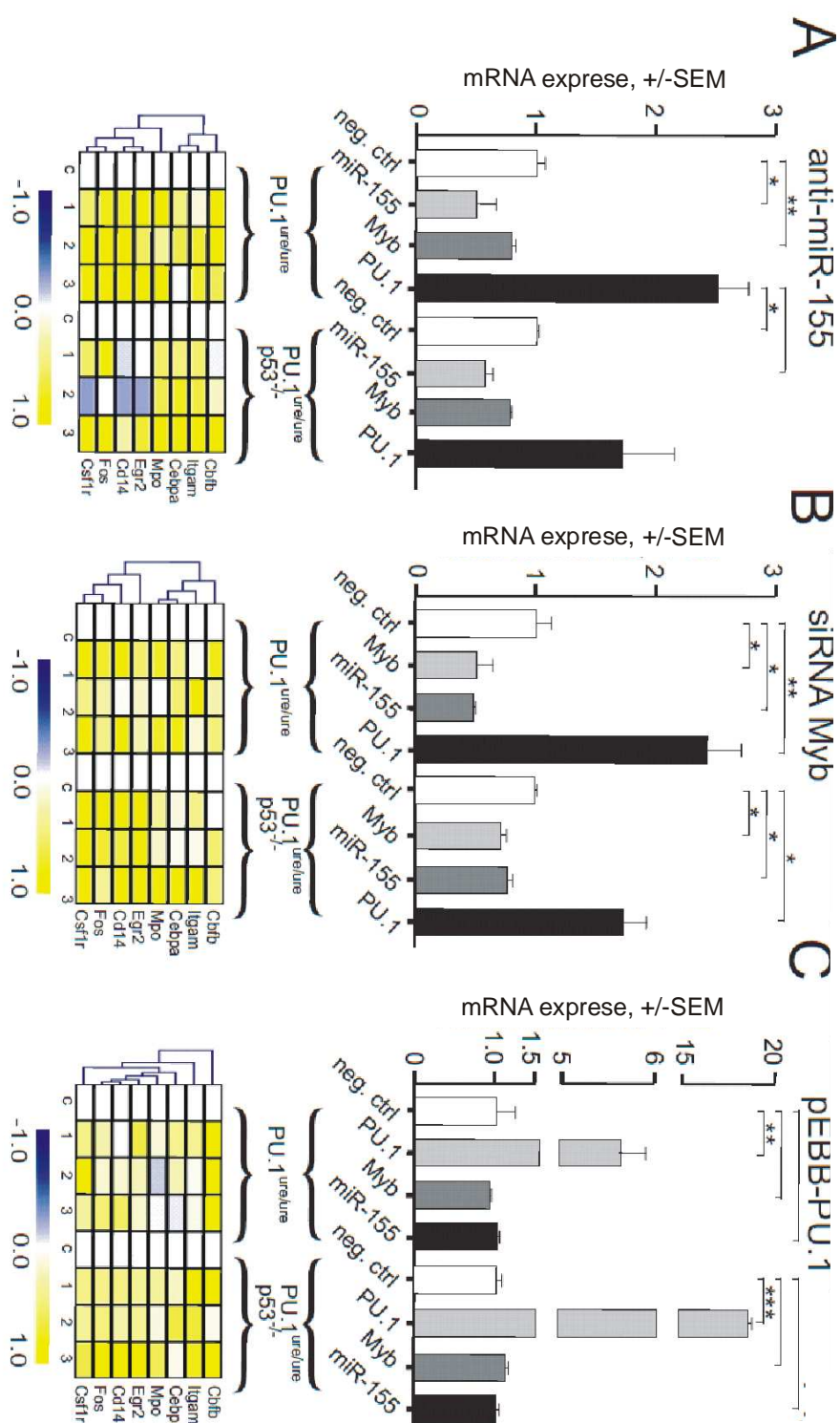
Funkční testy odhalující význam dráhy: p53/Myb/miR-155/PU.1 v myší AML.

Pro zjištění jednotlivých příspěvků Myb, miR-155 a PU.1 na diferenciaci a růst leukemických buněk, stejně tak pro možné testování vzájemné regulace mezi těmito faktory, jsme provedli následující experimenty:

Nejprve, jsme použili uvedený zvířecí model pro manipulaci exprese miR-155, Myb nebo PU.1, v *ex vivo* izolovaných AML blastech. Pomocí transientní (dočasné) transfekce inhibítorem anti-miR-155 byla snížena exprese miR-155, což se projevilo velmi výrazným zvýšením hladiny mRNA transkriptu PU.1 v progenitorech u obou AML modelů: PU.1^{ure/ure} a PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} (**Výsledkový obrázek 17A**). Indukce PU.1 se odrazila ve zvýšené expresi cílových mRNA včetně Cbfb, Itgam (Mac1), Cebpa, Bgr2, CD14, Fos a Csf1r (**Výsledkový obrázek 17A**). Dále byla inhibována exprese Myb pomocí siRNA a znovu bylo pozorováno výrazné zvýšení hladiny exprese PU.1 za současného snížení hladiny miR-155 (**Výsledkový obrázek 17B**). Tyto experimenty potvrdily, že exprese PU.1 je inhibována pomocí miR-155 a Myb a že inhibicí těchto dvou faktorů dochází k znovuoobnovení hladiny PU.1. Dalším výsledkem je, že inhibice Myb způsobuje pokles hladiny miR-155, což naznačuje, že Myb pozitivně reguluje miR-155 a že je regulátorem hladiny miR-155.

Dále jsme se rozhodli otestovat zda ektopicky navozená exprese PU.1 může znovuoobnovit myeloidní vývoj u progenitorů v mutantních modelech PU.1^{ure/ure} a PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}. c-Kit⁺ AML blasty byly transfekovány PU.1 expresním plasmidem (**Výsledkový obrázek 17C**) a následně bylo pozorováno výrazné zvýšení hladiny PU.1, jakožto i jeho cílových genů. Je zajímavé, že hladiny miR-155 a Myb nejsou příliš ovlivněny v uvedených časových sledech ektopickou expresí PU.1 (**Výsledkový obrázek 17C**).

V dalším kroku jsme zjišťovali, zda se Myb a miR-155 podílí na růstu leukemických blastů *in vitro* a zda-li znovuoobnovení exprese PU.1 může blokovat tyto účinky. Růst leukemických c-Kit⁺ buněk (**Výsledkový obrázek 17A-C**) závislý na

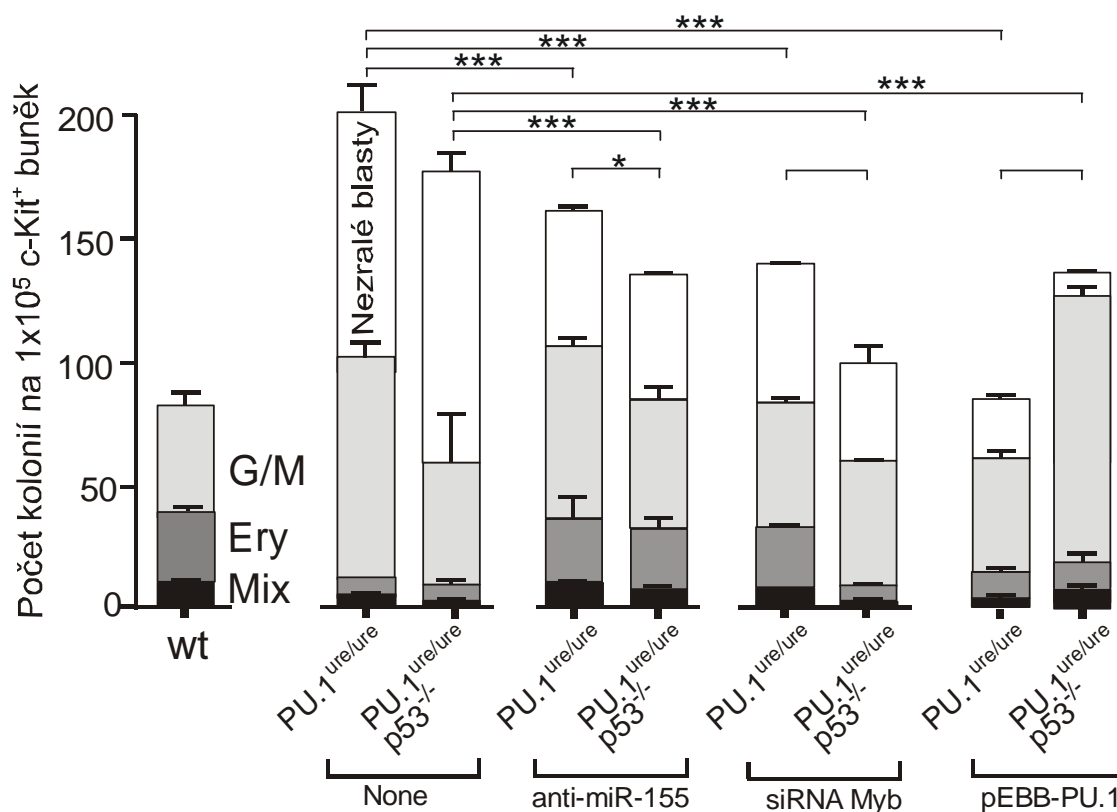


Výsledkový obrázek 17: Funkční charakterizace dráhy Myb/miR-155/PU.1 v myší AML.

c-Kit⁺ AML buňky daných genotypů transientně transfekovány oligonukleotidem (**A**) anti-miR-155 (konečná koncentrace 100nM), (**B**) siRNA Myb (konečná koncentrace 30nM), (**C**) PU.1 expresním plasmidem a negativní kontrolou (plasmid bez schopnosti exprimovat PU.1). Po 72 hodinách byla stanovena exprese mRNA pro PU.1, Myb a miR-155 pomocí TaqMan PCR. Na ose y je znázorněna relativní hladina mRNA exprese Myb a PU.1 vztažená k referenčnímu genu Hprt a exprese miR-155 je vztažená k snoRNA202, (kontroly byly přepočítány, aby byly rovny 1). *P*-hodnota (*t*-test, nepárový): * ≤ 0,05; ** ≤ 0,001; *** ≤ 0,0001.

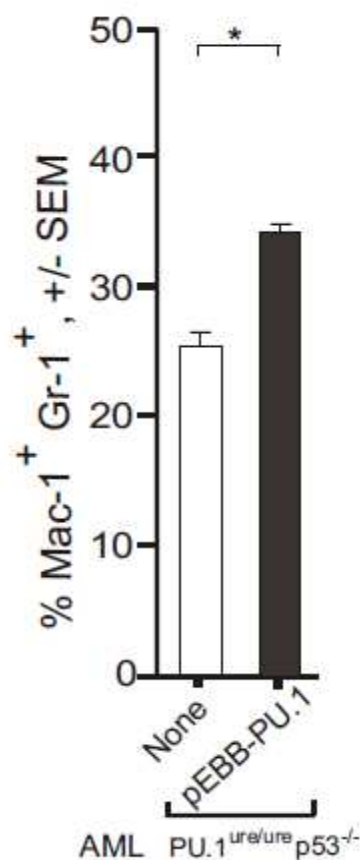
manipulaci hladiny Myb nebo miR-155 byl vyhodnocen za použití semisolidních metylcelulózních kultur. Zatímco WT progenitory vytvářejí diferenciuující CFU kolonie, progenitory z PU.1^{ure/ure} a PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} myši tvoří velké množství kolonií z nezralých buněk (**Výsledkový obrázek 18 vlevo a Obrázek 10, poznámka větší počet blastů a méně CFU kolonií v PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}**). Naproti tomu AML buňky transfekované s siRNA Myb, anti-miR-155 nebo PU.1 plasmidem tvoří výrazně méně kolonií nezralých buněk a naopak (podobně jako WT) více CFU kolonií (**Výsledkový obrázek 18, vpravo**). Toto je v souladu s expresními daty (**Výsledkový obrázek 17A-C**). Zajímavé je, že znovuoobnovení CFU kolonií bylo nejúčinnější v buňkách transfekovaných právě PU.1 expresním plasmidem, což potvrzuje klíčový význam hladiny PU.1. Vliv zvýšené exprese PU.1 na cílové geny pro PU.1 byl dále dokumentován pomocí průtokové cytometrie zvýšením počtu pozitivitních kolonií pro Mac1/Gr-1 vytvořených z progenitorů PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} (**Výsledkový obrázek 19**). Kromě toho, pomocí „replating assay“ u PU.1-transfekovaných progenitorů PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} bylo zjištěno, že zvýšená exprese PU.1 silně omezila leukemický potenciál agresivních AML progenitorů (**Výsledkový obrázek 20**).

Zvýšená exprese obou onkogenů Myb a miR-155 spolu se sníženou expresí PU.1 v modelu PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} může být důsledkem zvýšené nestability genomu s následnou klonální selekcí u myši se ztrátou p53 nebo nedostatkem přímé regulace těchto faktorů tumor supresorem p53. Pro otestování těchto dvou možností jsme použili transientní transfekci siRNA pro p53. Překvapivě jsme pozorovali, že dočasné snížení hladiny p53 na 40 % v progenitorech PU.1^{ure/ure} je postačující, aby postihlo expresi všech členů dráhy Myb/miR-155/PU.1 (včetně cílových genů PU.1), stejně jako cílový gen p53 - p21 (**Výsledkový obrázek 21 a Výledkový obrázek 22**). Bylo dosaženo zvýšení hladiny Myb (2-násobné), miR155 (2-násobné) a snížení hladiny PU.1 (3-násobné) i jeho cílových genů. Inhibice p53 vede jak ke zrychlení růstu leukemických buněk projevující se zvýšeným počtem kolonií nezralých buněk, tak současně k poklesu schopnosti diferenciac CFU kolonií (**Výledkový obrázek 23**). Tato data naznačují, že p53 se přímo podílí na regulaci onkogenní dráhy Myb/miR-155/PU.1 a že k deregulaci této dráhy pravděpodobně dochází brzy po úplné mutaci p53 v myších PU.1^{ure/ure}.



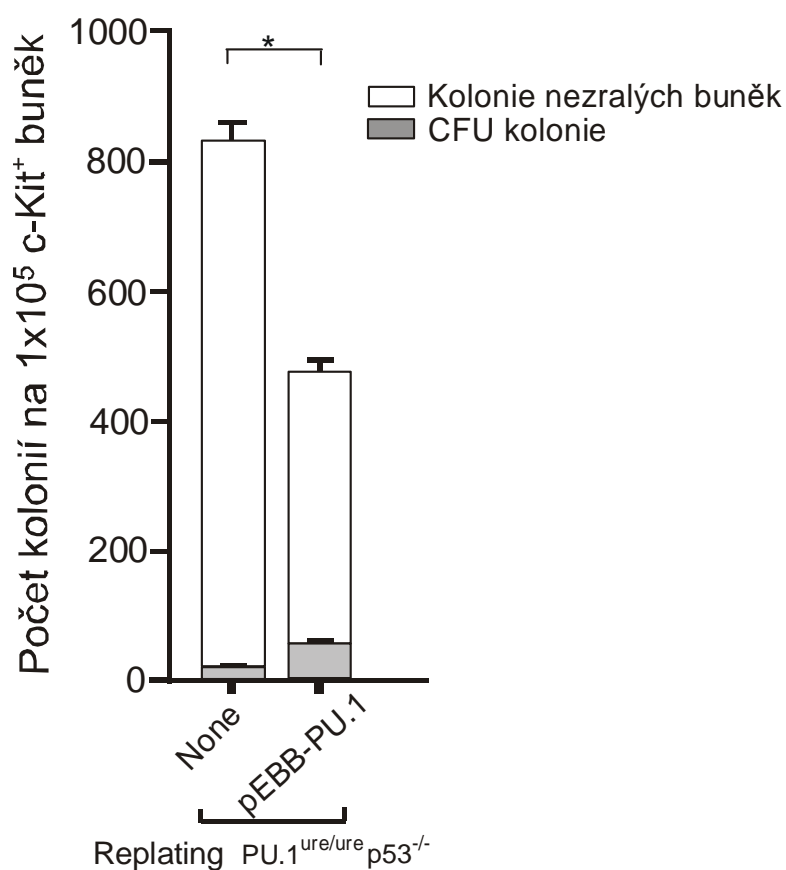
Výsledkový obrázek 18: Funkční charakterizace dráhy Myb/miR-155/PU.1 v myši AML pomocí perturbačních experimentů.

Průměrné počty leukemických nezralých buněk (bílé sloupce) a CFU kolonií kultivovaných z c-Kit⁺ buněk kontrolních wt a AML myši daného genotypu, preinkubovaných s nebo bez přítomnosti specifických oligonukleotidů anti-miR-155, siRNA Myb nebo PU.1 expresního plasmidu. Kolonie a nezralé blasty spočítané po 12 dnech kultivace: Mix=CFU-GEMM; Ery=BFU-E; G/M=CFU-M, CFU-G, CFU-GM. Průměr ± SEM počítáno v duplikátu. *P*-hodnota (*t* test, nepárový): * ≤ 0,05, ** ≤ 0,001, *** ≤ 0,0001.



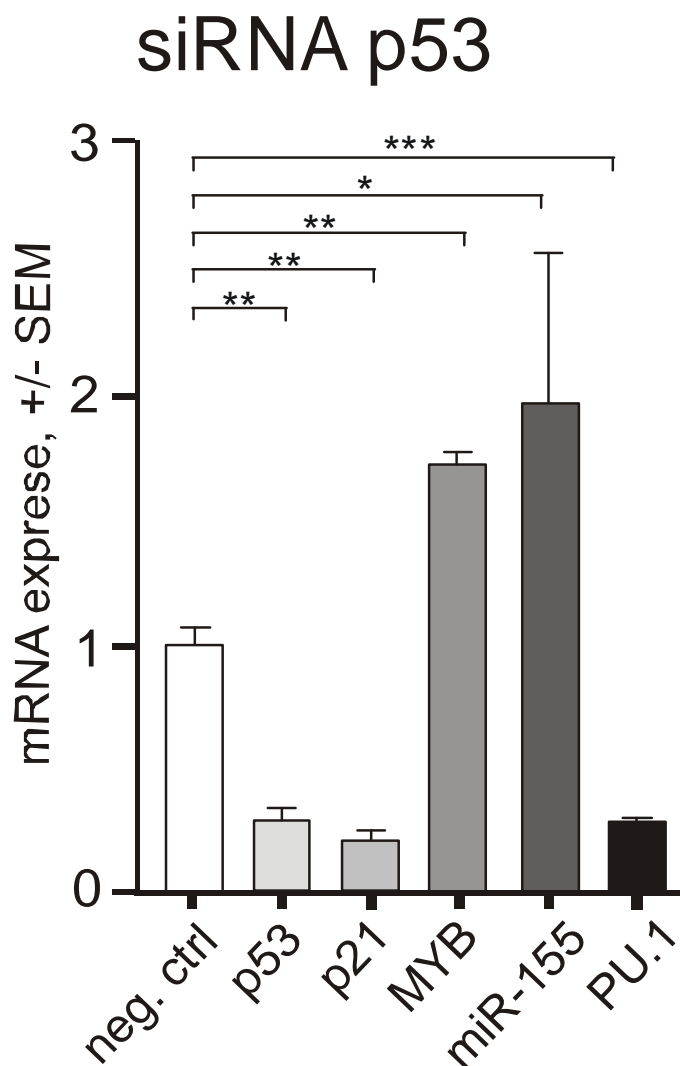
Výsledkový obrázek 19: Vliv zvýšené exprese PU.1 u AML na diferenciační potenciál AML blastů.

Detekce myeloidních buněk pomocí průtokové cytometrie na povrchové molekuly (Mac1, Gr-1). c-Kit⁺ blasty z myši PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} transfekovány pEBB-PU.1 plasmidem, kultivovány na semisolidním médiu po dobu 12 dní. Průměr ± SEM, *P*-hodnoty (*t*-test, nepárový): * ≤ 0,05, ** ≤ 0,001, *** ≤ 0,0001.



Výsledkový obrázek 20: Vliv zvýšené exprese PU.1 na růst leukemických buněk.

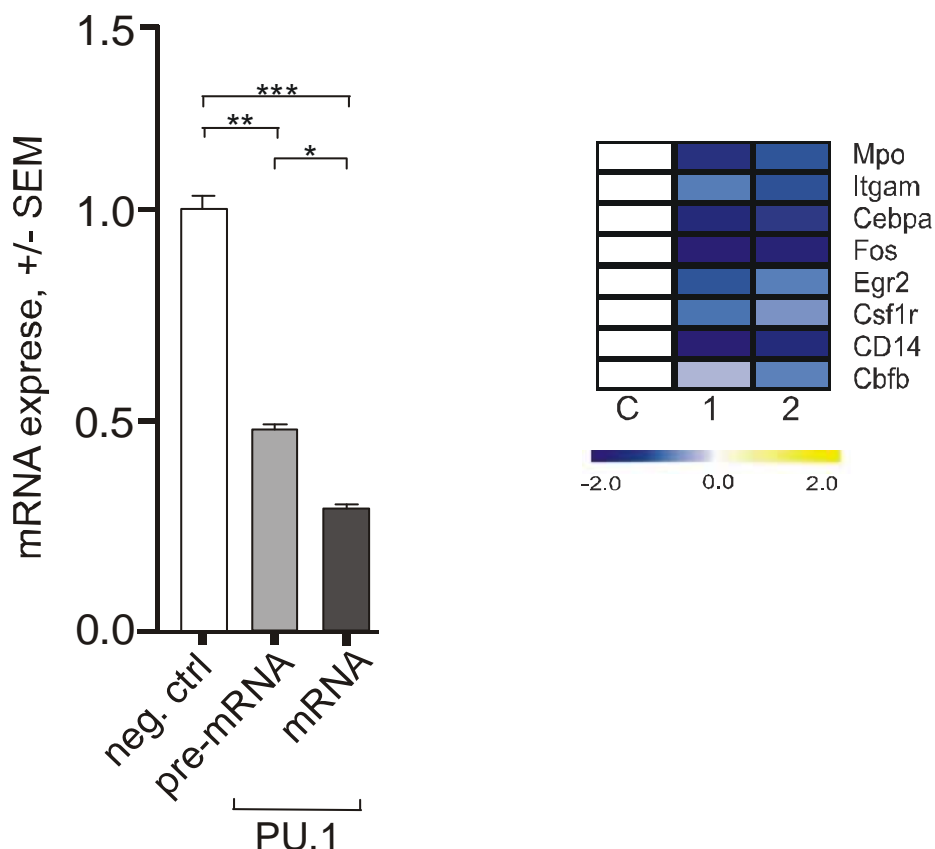
Nezralé buňky a CFU kolonie v opětovně vyseté semisolidní kultuře (7 den) („replating assay“). Transientně zvýšená exprese PU.1 v c-Kit⁺ progenitorech PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}. Průměr ± SEM, *P*-hodnoty (*t*-test, nepárový): * ≤ 0,05, ** ≤ 0,001, *** ≤ 0,0001.



Výsledkový obrázek 21: Snížení hladiny p53 v progenitorech PU.1^{ure/ure} vede k deregulaci dráhy Myb/miR-155/PU.1.

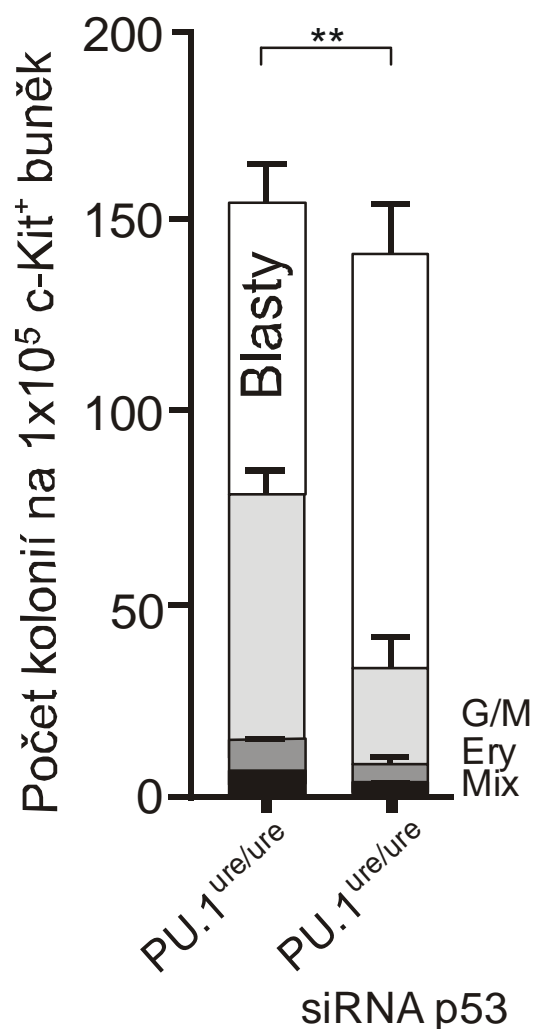
c-Kit⁺ AML buňky transientně transfekovány oligonukleotidem siRNA p53 (konečná koncentrace 30nM) a negativní kontrolou. Po 120 hodinách byla stanovena mRNA exprese PU.1, Myb, miR-155, p21 a p53 pomocí TaqMan PCR. Na ose y jsou znázorněny relativní hladiny mRNA exprese Myb, PU.1, p21 a p53 vztažené k referenčnímu genu Hprt a exprese miR-155 je vztažená k snoRNA202, (kontroly byly přepočítány, aby byly rovny 1). *P*-hodnota (*t*-test, nepárový): * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,001$; *** $\leq 0,0001$.

siRNA p53



Výsledkový obrázek 22: Porovnání hladin pre-mRNA a mRNA pro PU.1 v progenitorech PU.1^{ure/ure}.

c-Kit⁺ AML buňky transientně transfekovány oligonukleotidem p53 siRNA. (vlevo) Porovnání exprese pre-mRNA a mRNA genu PU.1 po snížení p53. (vpravo) heatmapa mRNA exprese cílů PU.1. Data ze dvou nezávislých experimentů (značeno 1-2 pod heatmapou). Průměr kontrol (značeno C). Průměr ± SEM (n=2). *P*-hodnota (*t*-test, nepárový): * ≤ 0,05; ** ≤ 0,001; *** ≤ 0,0001.



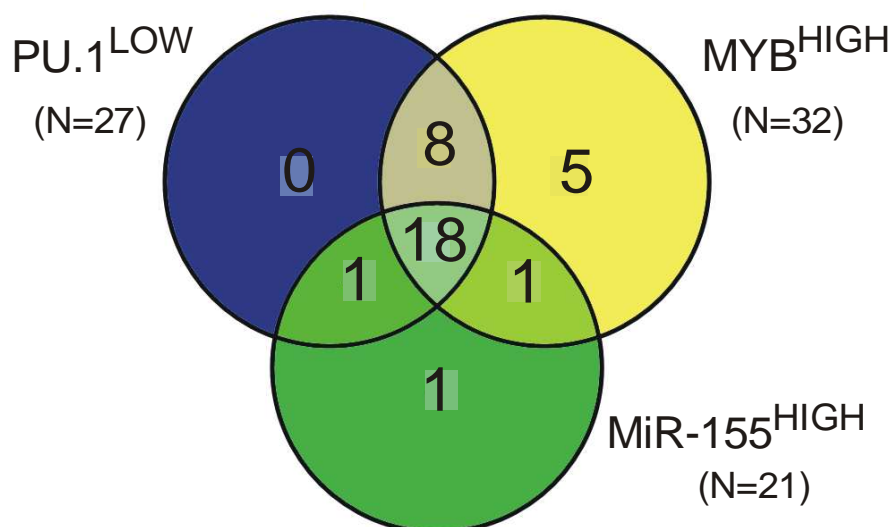
Výsledkový obrázek 23: Vliv inhibice p53 na růst kolonií z progenitorů PU.1^{ure/ure}. Průměrné počty leukemických nezralých buněk (bílé sloupce) a CFU kolonií kultivovaných ze c-Kit⁺ buněk AML myši PU.1^{ure/ure}, transfekovaných nebo bez přítomnosti specifického oligonukleotidu siRNA p53. Průměr ± SEM. *P*-hodnota (*t*-test, nepárový): * ≤ 0,05; ** ≤ 0,001; *** ≤ 0,0001.

Pro ověření hypotézy, že p53 na posttranskripční úrovni reguluje PU.1, jsme porovnali hladiny pre-mRNA a mRNA transkriptu PU.1 v p53 inhibovaných c-Kit⁺ progenitorech v modelu PU.1^{ure/ure}. Nižší hladina mRNA ve srovnání s pre-mRNA naznačuje, že PU.1 je skutečně regulována na posttranskripční úrovni. Protože je pre-mRNA lokalizována v jádře, není možná degradace zprostředkovaná pomocí microRNA, která probíhá v cytoplazmě (**Výsledkový obrázek 22**).

Dysregulace dráhy p53/Myb/miR-155/PU.1 je pozorovatelná i u lidské AML

K ověření a propojení našich poznatků z myší AML s lidskou AML jsme se rozhodli sledovat expresi miR-155, PU.1 a E-box proteinů (MYB, MYC) v periférních mononukleárních buňkách (PBMCs) v kohortě 36 pacientů s AML a 14 zdravých kontrol (**Tabulka 3 a Tabulka 4 v sekci Metody**).

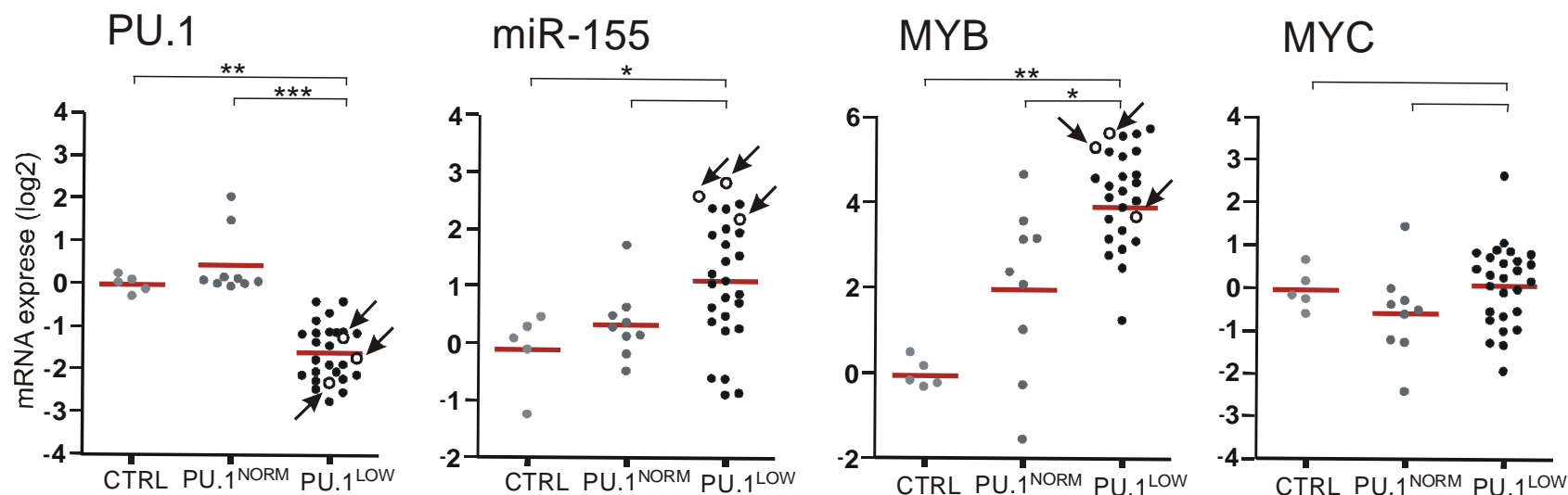
U většiny pacientů (27 z 36, 75 %) došlo k poklesu hladiny PU.1 ($P < 0,01$), v rozmezí 2-8 násobně nižším ve srovnání s kontrolní skupinou (**Výsledkový obrázek 24 a Výsledkový obrázek 25**). Nejprve na základě expresní hladiny PU.1 byly AML pacienti rozděleni do dvou skupin, 1) normální (NORM, $FC_{\log 2} < -0,5$) nebo 2) sníženou (LOW, $FC_{\log 2} > -0,5$) hladinou PU.1. Dále jsme porovnali expresi PU.1, miR-155, MYB a MYC v rámci každé skupiny. Podobně jako v myším modelu, 70 % pacientů ve skupině s nízkou hladinou PU.1 (PU.1-LOW) vykazovalo nárůst exprese miR-155 ($p < 0,05$), ukazující na negativní korelaci PU.1/miR-155 (Spearman, $r = -0,347$, $p = 0,038$, **Výsledkový obrázek 26**). Dále byl onkogen MYB (na rozdíl od MYC) exprimován ve vyšší míře u 96 % PU.1-LOW pacientů, což ukazuje na významnou negativní korelaci s PU.1 ($r = -0,582$, $p = 0,0006$). Kromě toho byla nalezena pozitivní korelace mezi MYB a miR-155 ($r = 0,223$, $p = 0,069$), což ukazuje, že oba tyto onkogeny spolupracují na snížení hladiny PU.1 v klinické AML. Kontrolní skupina, obsahující B- a T- depletované PBMCs a CD34⁺ buňky separované z PB zdravých dárců, je znázorněna ve **Výsledkovém obrázku 27**.



AML pacienti N=36

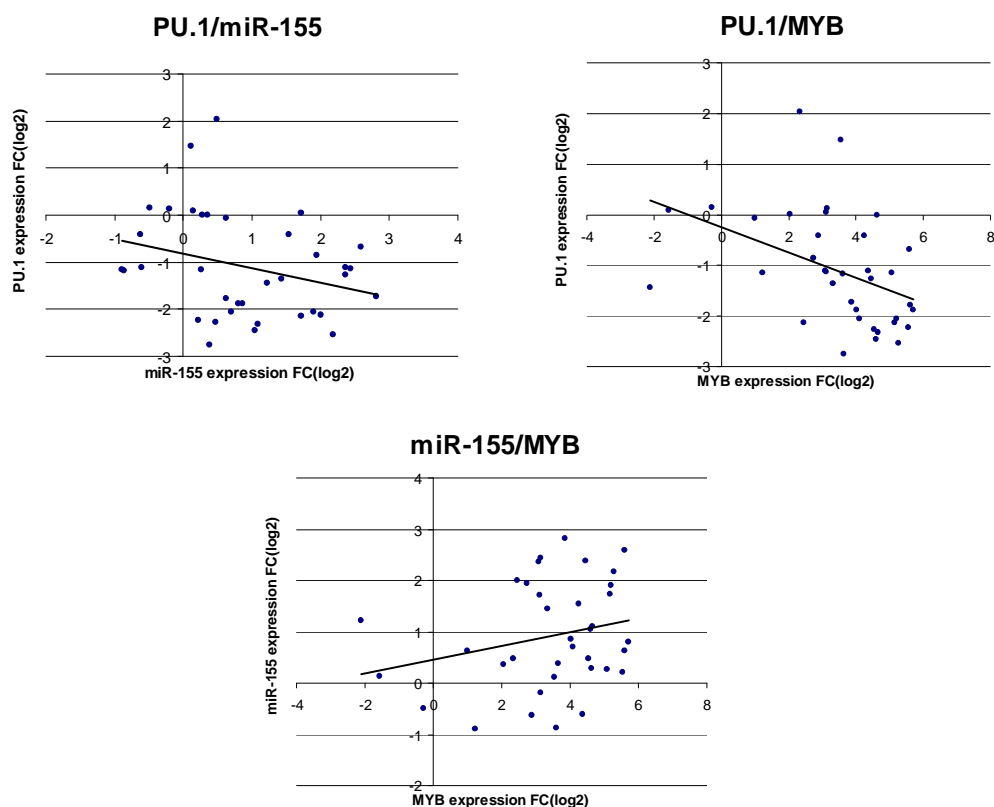
Výsledkový obrázek 24: Vennův diagram mRNA exprese PU.1^{LOW}, miR-155^{HIGH} a MYB^{HIGH} u pacientů s AML.

Na základě expresní hladiny PU.1 byli vybráni AML pacienti se sníženou (LOW, $FC_{\log 2} > -0,5$) hladinou PU.1. Pomocí Vennova diagramu byla porovnána snížená exprese PU.1 a současně zvýšená exprese miR-155 a MYB v rámci této skupiny.



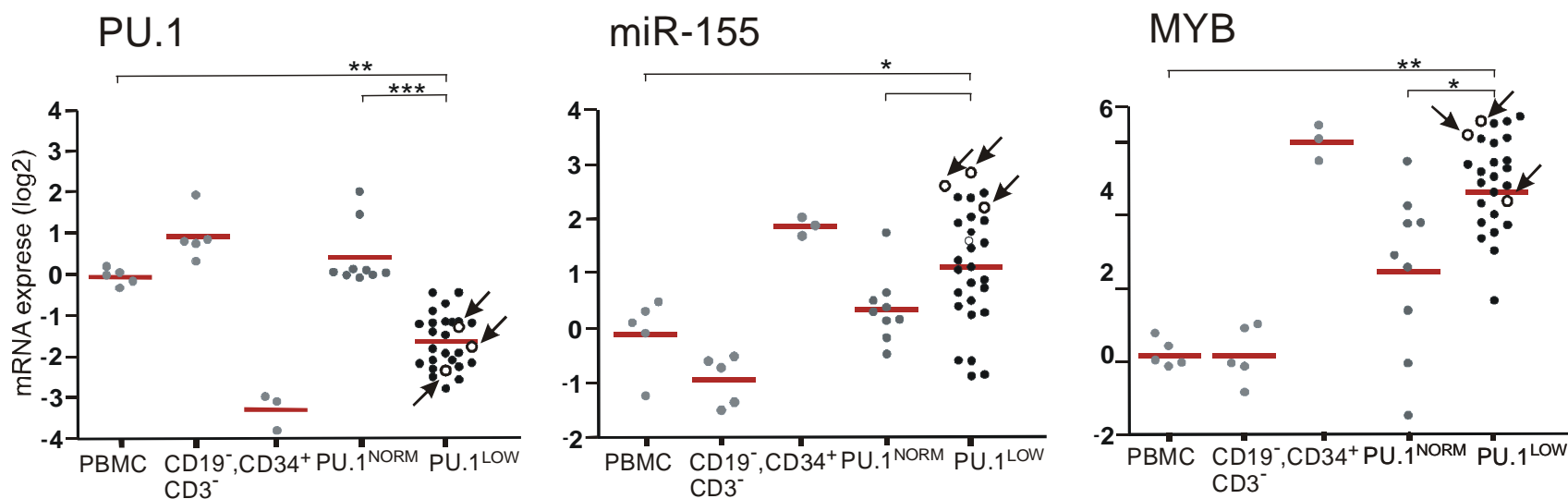
Výsledkový obrázek 25: Analýza exprese PU.1, miR-155 a E-box mRNA u pacientů s AML.

Exprese transkriptu PU.1, miR-155, MYB a MYC byla stanovena v lidských AML PBMCs pomocí TaqMan PCR. Na ose y je znázorněna relativní hladina mRNA exprese (log2) vztažená k průměru exprese zdravých kontrol (CTRL, N=5). PU.1, MYB a MYC jsou vztažené k referenčnímu genu GAPDH a exprese miR-155 je vztažená k RNU44. *P*-hodnota (One-way ANOVA, Kruskal-Wallis): * ≤ 0,05; ** ≤ 0,001; *** ≤ 0,0001.



Výsledkový obrázek 26: Korelační analýza exprese mRNA.

Korelační analýza mezi mRNA expresí PU.1 a miR-155 ($r = -0,347$, $p = 0,038$), PU.1 a MYB ($r = -0,582$, $p = 0,0006$) a miR-155 a MYB ($r = 0,223$, $p = 0,069$). (Korelace Spearman, two tailed, 95% interval spolehlivosti). Expres transkriptu PU.1, miR-155 a MYB (vztažena k GAPDH) byla stanovena z izolovaných PBMCs získaných od pacientů s AML a zdravých kontrol. Osy x a y jsou ve škále log2, přímka označuje regresní křivku.

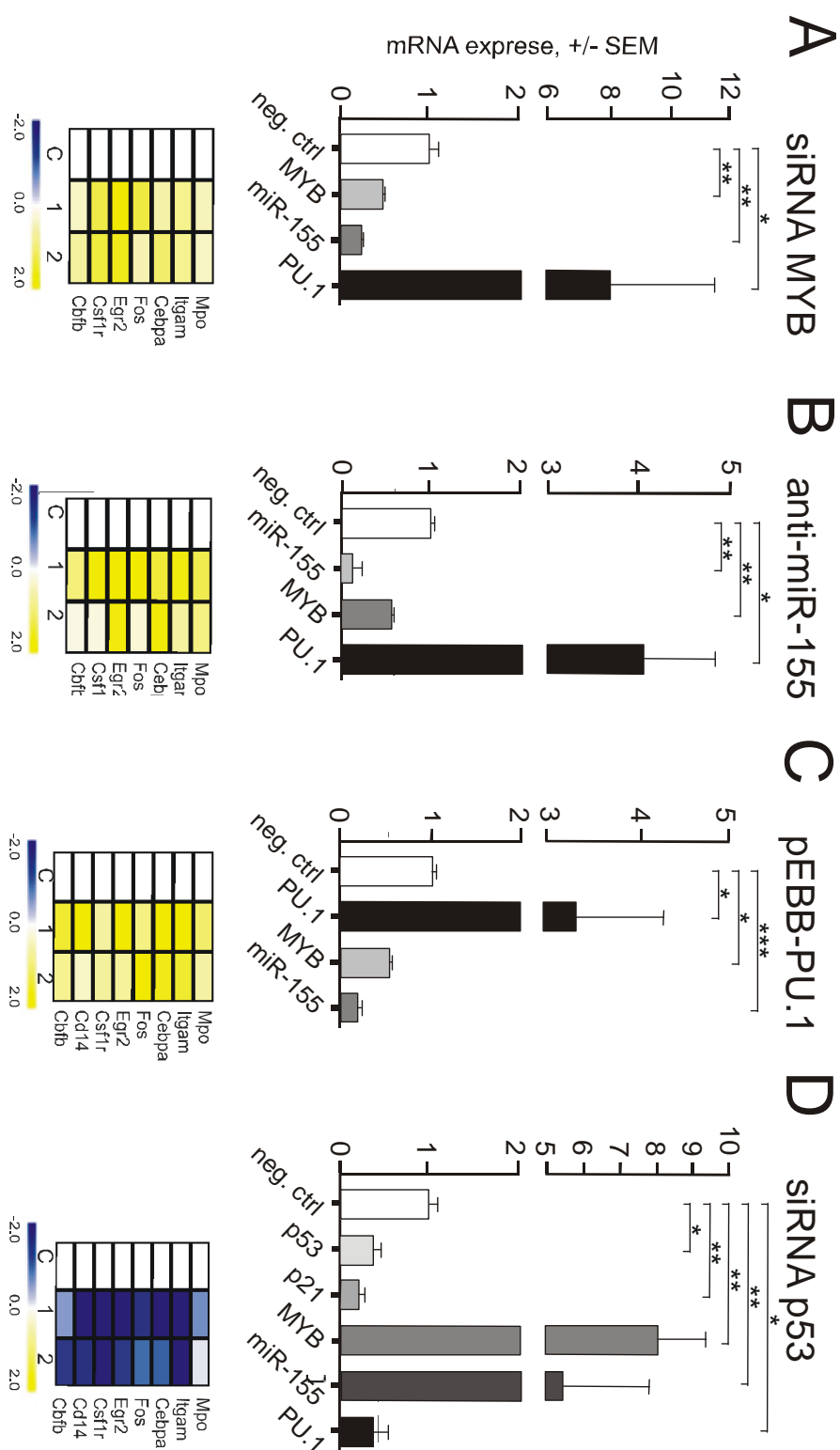


Výsledkový obrázek 27: Analýza exprese PU.1, miR-155 a MYB mRNA u pacientů s AML a zdravých kontrol. Pomocí RT-PCR byla stanovena exprese transkriptu PU.1, miR-155, MYB a MYC v lidských buněčných frakcích: PBMCs-nabohacené na CD34⁺, CD19/CD3-depletované PBMCs, a PBMCs separované pomocí Ficoll. Na ose y je znázorněna relativní hladina exprese (log2) vztažená k průměru exprese zdravých kontrol (CTRL, N=5). PU.1, MYB a MYC jsou vztaženy k referenčnímu genu GAPDH a exprese miR-155 je vztažena k RNU44. *P*-hodnota (One-way ANOVA, Kruskal-Wallis): * ≤ 0,05; ** ≤ 0,001; *** ≤ 0,0001.

K podrobnému vysvětlení role inaktivovaného p53 v lidských AML a jeho vztahu k dráze MYB/miR-155/PU.1 jsme brali v úvahu i cytogenetický stav p53 u našich pacientů s AML. Delece lokusu 17p13 nesoucí gen p53 byla nalezena u tří pacientů s AML a překvapivě všichni tito pacienti patřili do skupiny PU.1-LOW, která má nejvyšší hladinu MYB a miR-155 (jsou označené šipkami na **Výsledkovém obrázku 25**). Samozřejmě bereme na vědomí, že detekce delece p53 metodou FISH byla limitována pouze na pár vzorků, a proto by mohl být počet delecí genu p53 v kohortě pacientů vyšší.

Korelace mezi hladinami Myb, miR-155, a expresí PU.1 v lidské AML nemusí nutně znamenat, že přímo regulují agresivitu AML, jak bylo pozorováno u myší. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli použít buněčnou linii lidské AML - NB4 a manipulovat s hladinami dráhy MYB/miR-155/PU.1 a p53. Inhibice MYB snížila hladinu miR-155 a současně zvýšila expresi PU.1 podobně jako v myší AML (**Výsledkový obrázek 28A**). Inhibice miR-155 zvýšila expresi PU.1; avšak pravděpodobně znovuoobnovení PU.1, vedlo ke snížení MYB, což naznačuje, že PU.1 může fungovat jako represor MYB (**Výsledkový obrázek 28B**). Restaurováním exprese PU.1 v NB4 buňkách má za následek snížení hladiny MYB a jeho downstream cíle miR-155 (**Výsledkový obrázek 28C**). Dále jsme NB4 buňky transfekovali siRNA p53, což vedlo k derepresi obou onkogenů MYB a miR-155 a současně ke snížení hladiny PU.1 a jeho cílů (**Výsledkový obrázek 28D**), podobně jako u myší AML. Tato data naznačují, že regulační dráha p53/MYB/miR-155/PU.1 je funkční i v lidské AML.

Patologické zvýšení hladin onkogenů miR-155 a Myb v souladu se snížením exprese PU.1 nás vede k rozvaze, že regulační dráha MYB/miR-155/PU.1 patří mezi ty mechanismy, které přispívají ke snížení hladiny PU.1 u části lidských AML, a to zejména v agresivních případech, vyznačujících se mutací p53.



Výsledkový obrázek 28: Snížení hladin mRNA pro MYB, miR-155, PU.1 a p53 v lidské AML.

Pomocí RT-PCR byla stanovena mRNA exprese v NB4 buňkách transfektovaných: (A) siRNA Myb (96 hodin), (B) anti-miR-155 (96 hodin), (C) PU.1expresním plasmidem (48 hodin), (D) siRNA p53 (48 hodin). Na ose y je znázorněna relativní hladina exprese PU.1, MYB, p53 a p21 vztažená k referenčnímu genu GAPDH a exprese miR-155 je vztažená k RNU44, (kontroly byly rovny 1). Každý graf je doprovázen Heatmapou (spodní panel) ukazující změny v mRNA exprese jednotlivých cílových genů PU.1 po snížení hladin uvedených molekul. Data pochází ze 2 nezávislých experimentů (1-2 na spodní části Heatmapy). Průměr z kontrolních skupin (c). Průměr \pm SEM. *P*-hodnota (*t*-test, nepárový): * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,001$; *** $\leq 0,0001$.

DISKUZE

Akutní myeloidní leukémie je klonální maligní onemocnění jež vykazuje rozličnou agresivitu. Příčiny vzniku tohoto onemocnění a četné rozdíly v agresivitě AML jsou i přes intenzivní výzkum dosud nejasné. Naše výzkumná práce se zaměřuje na identifikaci molekulárních mechanismů spojených se sníženou hladinou tumor supresorového genu PU.1.

Představili jsme zde důkaz, že myši s dvojitou mutací PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} vykazují velmi nízké hladiny PU.1 a rozvíjí se u nich vysoce agresivní rysy AML (ve srovnání s myším modelem pouze s mutací PU.1^{ure/ure}), což podporuje celkovou představu, že regulace hladiny PU.1 se podílí na vzniku akutní leukemie (Metcalf et al., 2006; Mueller et al., 2002; Mueller et al., 2006). Extrémně nízká hladina PU.1 se vyskytuje v HPSCs a progenitorech, ale tato hladina se dále výrazně aktivuje v průběhu vývoje myeloidních buněk (Dahl et al., 2003). Nízké hladiny PU.1 jsou dostatečné pro stimulaci vývoje buněk až do úrovně myeloidních blastů, ale následně, pokud se PU.1 nezvýší, dojde k bloku myeloidní diferenciace. Naše současná (**Výsledkový obrázek 17C a Výledkový obrázek 28C**) i dříve získaná data v jiných modelech AML (Burda et al., 2009) ukazují, že restaurováním hladiny exprese PU.1 dochází k znovuoobnovení myeloidní diferenciace leukemických blastů. Tyto modely znovuoobnovy také ukazují, že nízké hladiny PU.1 nejsou schopny efektivně stimulovat transkripci PU.1 cílových genů potřebných pro myelopoézu a zároveň nejsou schopny účinně potlačovat onkogenní transkripční faktory: Myb a Myc, známé aktivátory buněčné proliferace a inhibitory myeloidní maturace (zrání) (Pattabiraman & Gonda, 2013). V porovnání s modelem PU.1^{ure/ure} vyvíjejí myši s dvojitou mutací (PU.1 a p53) agresivní AML, která se vyznačuje rychlým metabolickým rozvratem a hubnutím, rychle se rozvíjejícími a expandujícími blasty, těžkou anémií, trombocytopenií související s megakaryocytární dysplazií v kostní dřeni a slezině, obří velikostí sleziny a jater (hepatosplenomegalii), agresivnějším leukemickým růstem blastů *in vitro* a výrazně kratším přežíváním (**Výledkový obrázek 1-9**). Zajímavé však je, že například exprese povrchových molekul je u obou AML modelů velmi podobná. To ukazuje na to, že se

jedná v obou případech o stejný podtyp AML. Námi pozorované molekulární mechanismy jsou spojené s agresivitou AML (jako např. regulační vztahy a změny v expresi v dráze Myb/miR-155/PU.1, které vedou ke dvěma různým hladinám PU.1). Zdá se, že tyto mechanismy jsou přítomny v AML modelech jak s jednou (PU.1) tak i s dvojitou (PU.1, p53) mutací, nicméně v dvojitých mutantech jsou výrazně aktivnější (Výsledkový obrázek 11-15).

AML v myších s kombinovanou mutací PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} souvisí se zvýšenou hladinou E-box proteinů (Myb i Myc) a onkogenu miR-155. Ve dvojitém mutantu je výrazně zvýšená hladina obou těchto proteinů oproti modelům pouze s mutací PU.1^{ure/ure} nebo p53^{-/-}. **Položili jsme si otázku, proč zvýšená hladina Myb neaktivuje miR-155 pouze v myších s mutací tumor supresoru p53, tak jak tomu je v případě mutantu PU.1^{ure/ure} nebo kombinovaného mutantu PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}?** Domníváme se, že hlavním faktorem, jež řídí hladinu miR-155 v modelech PU.1^{ure/ure} a PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} (umocněna ještě ztrátou p53), je nedostatečná represe Myb řízená pomocí transkripčního faktoru PU.1. Tato represe umožňuje aktivaci miR-155, který pak dále snižuje hladinu PU.1 vedoucí ke vzniku AML. Tato hypotéza je podpořena experimenty v progenitorech PU.1^{ure/ure}, kde byla pomocí siRNA inhibována hladina p53, čímž došlo ke zvýšení exprese onkogenů Myb a miR-155 a k další inhibici PU.1 programu (Výsledkový obrázek 21-22).

Experiment s krátkodobou inhibicí p53 pomocí siRNA poskytl důkaz, že p53 pravděpodobně přímo ovlivňuje expresi Myb (a dráhu Myb/miR-155/PU.1). Jde patrně o časný děj v kaskádě kroků iniciovaných delecí/mutací p53 v myši a nikoliv o náhodnou kumulaci následků způsobených genomovou nestabilitou s následnou klonální selekcí. Přestože ztráta p53 vede k několika změnám na úrovni HSPCs - například ovlivňuje klidovou fázi (quiescence) a sebeobnovu (Abbas et al., 2011), tento nedostatek p53 sám o sobě nestačí ke snížení exprese PU.1, zvýšení hladiny miR-155 nebo dokonce způsobení onemocnění AML.

Publikace uvádějí, že PU.1 může snížit expresi E-box proteinů (Rao et al., 1997; Rosenbauer et al., 2004). V souladu s těmito pozorováními, naše experimenty s PU.1

expresním plasmidem v buněčné linii lidské AML - NB4 naznačují, že PU.1 je represor onkogenu MYB (**Výsledkový obrázek 28C**). Je zajímavé, že u obou typů myších progenitorů PU.1^{ure/ure} nebo PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} neovlivnila obnovená exprese PU.1 expresi onkogenů Myb nebo miR-155 (**Výsledkový obrázek 17C**). Tato data dokumentují rozdíly mezi myší a lidskou AML.

Zvýšená hladina exprese transkriptů MYB, miR-155 a PU.1 vzájemně koreluje s poměrně velkou částí kohorty lidských pacientů s AML (**Výsledkový obrázek 24-25**). Současně jsme poskytli důkaz, že onkogeny Myb a miR-155 funkčně spolupracují na snižování hladiny exprese PU.1 v myším modelu AML. To naznačuje, že dráha MYB, miR-155 a PU.1 je funkční i v lidské AML a představuje patrně mechanismus zodpovědný za snížení hladiny PU.1. Zjistili jsme, že pacienti s nízkou expresí PU.1 (značené PU.1-LOW) společně s delecí p53 (označené na **Výsledkovém obrázku 25** šipkami) exprimují nejvyšší hladinu miR-155 a MYB, což naznačuje, že další zvýšení exprese onkogenů miR-155 a MYB souvisí s agresivními rysy identifikovanými v PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} AML.

Vyšší počet AML pacientů se zvýšenou hladinou MYB (~ 92 %) než pacientů se zvýšenou hladinou miR-155 (~ 58 %), naznačuje, že MYB má širší regulační potenciál než miR-155 a patrně aktivuje sadu jiných faktorů v AML, než miR-155. Podle předpovědí *in silico* (Targetscan.org) má miR-155 schopnost postranskripčně snižovat expresi přibližně 440 konzervovaných cílových mRNA. Jako taková může miR-155 kromě PU.1 snižovat hladinu i dalších genů, které mohou přispívat ke vzniku AML. Podobně i další microRNA, které interferují s transkripčním programem PU.1 (kromě miR-155) mohou přispívat k patologii AML, například onkogenní klastr miR-17-92 (Pospisil et al., 2011), nebo miR-34 (Sokol et al., 2011), oba jsou regulovány tumor supresorem p53. V publikacích (včetně i z naší laboratoře) bylo prokázáno, že hladiny mikroRNA z onkogenního klastru miR-17-92 a jeho dvou paralogů miR-106a-93 a miR-106b-25 jsou zvýšené v AML (Dixon-McIver et al., 2008; Li et al., 2008; Pospisil et al., 2011; Yan et al., 2009). V souladu s dalšími publikace jsme ukázali, že tumor supresor p53 může reprimovat klastr miR-17-92 (Yan et al., 2009), jelikož oba myší modely s delecí p53: p53^{-/-} a PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} mají výrazně zvýšenou expresi klastru

miR-17-92. V dřívější publikaci naší laboratoře bylo popsáno (Pospisil et al., 2011), že PU.1 reprimuje transkripci miR-17-92 nepřímo. Proto nízké hladiny PU.1 pravděpodobně nejsou dostačující pro represi klastru miR-17-92 v obou myších modelech s delecí úseku URE: PU.1^{ure/ure} a PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}. Oba tyto mechanismy (nízká hladina PU.1 a ztráta p53) mohou v modelu s dvojitou mutací PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} vést k deregulaci klastru miR-17-92, která následně podporuje proliferaci a větší přežití nádorových buněk.

Naše pozorování zvýšené exprese miR-155, a současné snížení hladiny PU.1 u lidské AML (O'Connell et al., 2008) a MDS (Curik et al., 2012; Sokol et al., 2011) jsou v souladu s již dříve publikovanými poznatky. Z důvodu propojení těchto dvou onemocnění častou transformací MDS do AML (v naší kohortě pacientů se nachází 8 MDS/AML a 4 MDS pacienti) jsme v naší předchozí práci (Curik et al., 2012) ukázali, že pacienti s nízkou hladinou exprese PU.1 mají významně horší prognózu při léčbě pomocí Azacytidinu, pokud jde o dobu celkového přežití, než pacienti se střední a vysokou expresí PU.1. (**Příloha 2, Figure 1a-b**). Oproti tomu Azacytidinem zvýšená exprese PU.1 na úrovni mRNA i proteinu v modelových buněčných liniích MDS je provázána myeloidní diferenciací leukemických buněk (**Příloha 2, Figure 2a-c**). To naznačuje, že hladina exprese PU.1 představuje významný prognostický faktor. Náš nový model akcelerace AML v hypomorfních myších mutantech s delecí PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} vytváří užitečný nástroj pro testování mechanismů týkajících se účinnosti léčby AML zaměřených na znovuoobnovení exprese PU.1.

Výsledky v naší další publikaci ukazují, že kromě AML je MYB funkční také v dráze MYB/miR-155/PU.1 u lymfoidních nádorových buněk získaných od pacientů s chronickou lymfatickou leukémií (CLL) (Vargova et al., 2011, **Příloha 3, Figure 1A**). Analýza histonových modifikací v chromatinové oblasti cíleně vázající MYB na lokusu *MIR155HG* ukazuje jisté rozdíly mezi nádorovými buňkami CLL a AML blasty (**Příloha 3, Figure 3, Výsledkový obrázek 14A-B**). Navzdory těmto rozdílům může onkogenní dráha Myb/miR-155/PU.1 představovat obecný mechanismus fungující v HSPCs a může být zapojena do vývoje dalších hematologických malignit. Inhibice exprese onkogenu miR-155 nebo znovuoobnovení hladiny PU.1 (**Výsledkový obrázek**

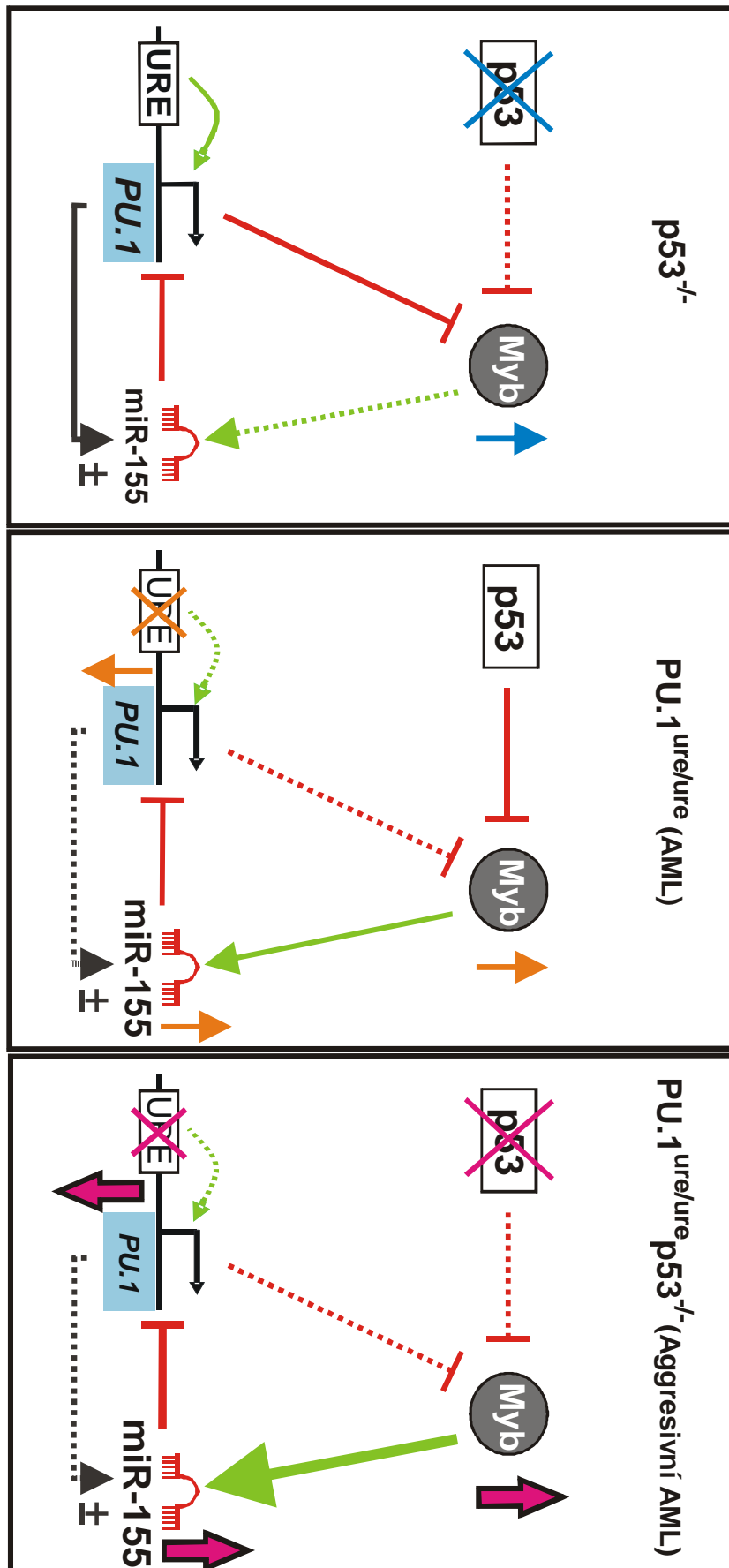
17A, 17C, Výsledkový obrázek 28B-C) může být cennou strategií pro obnovu diferenciaci progenitorových buněk. Navíc faktory regulující transkripci *MIR155HG*, jako jsou například E-box proteiny MYB nebo MYC, jsou ideální cíle pro soustředěnou diferenciací léčbu lidských leukémií (Neiman et al., 2008; Vargova et al., 2011).

Na základě našich pozorování jsme navrhli zcela nový mechanismus vysvětlující patogenezi agresivní AML (**Výsledkový obrázek 29**). Primární AML je iniciována deregulací sítě myeloidních genů, jako je například snížení hladiny exprese transkripčního faktoru PU.1. Dojde-li k další mutaci, jako je například ztráta tumor supresoru p53, nastane i další dysregulace sítě. Konkrétněji, po delecii p53 a URE oblasti vzroste exprese obou onkogenů Myb a miR-155 a současně dojde k výraznému snížení hladiny transkripčního faktoru PU.1. Další snižování hladiny exprese PU.1 přispívá k agresivnější formě onemocnění.

Navrhli jsme tři následující možnosti: 1) v myším modelu $p53^{-/-}$ s delecí pouze tumor supresoru p53 je exprese E-box proteinů Myb (a také Myc) pouze mírně zvýšena (**Výsledkový obrázek 29, levý panel**). Je možné, že normální hladina exprese PU.1 brání další deregulaci Myb. miR-155 (regulovaný přes homeostatickou zpětnou vazebnou smyčku transkripčním faktorem PU.1) není při normální hladině PU.1 deregulovaný. V důsledku toho, nedochází ke vzniku AML. Oproti tomu, 2) v myším modelu $PU.1^{ure/ure}$ s delecí oblasti URE (**Výsledkový obrázek 29, prostřední panel**) dochází ke snížení hladiny tumor supresoru PU.1 na 20 %, což vede současně ke zvýšení exprese E-box proteinů (Myb a Myc) a ke zrušení kontroly *miR-155hg*. Důsledkem toho je zvýšená exprese transkriptu miR-155. Z publikací je známo, že zvýšená exprese onkogenu miR-155 dále inhibuje expresi PU.1 (O'Connell et al., 2008). Snížená hladina PU.1 a zvýšená exprese miR-155 přispívají ke vzniku nádorového onemocnění AML. Kombinací těchto dvou předešlých možností, 3) je námi vytvořený nový myší model $PU.1^{ure/ure} p53^{-/-}$ s mutací obou tumor supresorů p53 a PU.1 (**Výsledkový obrázek 29, pravý panel**). V důsledku těchto mutací (p53 a PU.1) je neefektivně reprimován onkogen Myb a dochází k dalšímu výraznému vzrůstu hladiny exprese Myb. Následně tato vysoká exprese Myb aktivuje miR-155, který ještě více

sniží hladinu exprese PU.1. Dráha Myb/miR-155/PU.1 je vysoce aktivovaná, což vede ke zrychlené patogenezi AML se zřetelnými agresivními rysy.

Vytvořili jsme nový myší model pro studium vlivu ztráty tumor supresoru p53 na patogenezi AML onemocnění. Identifikovali jsme námi testovaný mechanismus, jež jsme objevili u myší AML, a který je odpovědný za snižování hladiny exprese tumor supresoru PU.1 v myší AML a ukázali jsme jeho případné zapojení v patogenezi a agresivitě lidské akutní myeloidní leukemie.



Výsledkový obrázek 29. Model regulace Myb, miR-155 a PU.1 u agresivní myši AML.

(levý panel) Model $p53^{-/-}$ pouze s mírně zvýšenou hladinou Myb (a případně také Myc) (znázorněno modrou šipkou). K vyšší expresi Myb nedochází v důsledku přítomnosti normální hladiny PU.1, která současně potlačuje (znázorněno červeně) hladinu Myb. miR-155 není při normální hladině PU.1 deregulována. Zvýšená exprese miR-155 není pozorována (znázorněno přerušovanou zelenou šipkou). V důsledku toho nedochází ke vzniku AML.

(prostřední panel) Model $PU.1^{ure/ure}$ se sníženou hladinou PU.1 (znázorněno oranžovou šipkou) vede k nedostatečně inhibici Myb (znázorněno červenou přerušovanou čarou), což vede současně ke zvýšení exprese Myb a ke zrušení kontroly *miR-155hg* (znázorněno přerušovanou černou šipkou). Důsledkem toho je zvýšená exprese onkogenu miR-155, který dále inhibuje expresi PU.1 (znázorněno červenou čarou). Snížená hladina PU.1 a zvýšená exprese miR-155 přispívají ke vzniku AML.

(pravý panel) Model $PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}$ s výrazně zvýšenou expresí Myb (znázorněno tučnou růžovou šipkou) v důsledku neefektivní represe Myb oběma tumor supresory: PU.1 a p53 (znázorněno červenými přerušovanými čarami). Následně tato vysoká exprese Myb silně aktivuje miR-155 (znázorněno tučnou zelenou šipkou), která ještě více sníží hladinu exprese PU.1 (znázorněno červenou čarou). Dráha Myb/miR-155/PU.1 je vysoce aktivovaná, což vede ke zrychlené patogenezi AML se zřetelnými agresivními rysy.

(Zkratky: URE - upstream regulatory element genu *PU.1*, \rightarrow značí aktivaci, \top značí represi).

SHRnutí ZÁVĚRŮ DISERTAČNÍ PRÁCE

Agresivní AML je spojena s nedostatkem tumor supresorů PU.1 a p53, jejichž koincidence zhoršuje průběh AML.

Myši s delecí obou tumor supresorů PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} vyvíjejí agresivnější formu AML ve srovnání s myši pouze s mutací PU.1^{ure/ure}. Agresivní forma se projevuje: vyčerpáním metabolických rezerv, rychle se rozrůstajícími a expandujícími nezralými buňkami, těžkou anémií, trombocytopenií související s megakaryocytární dysplazií v kostní dřeni a slezině, agresivním chováním blastů *in vitro* a zkráceným přežíváním.

Mezi oběma tumor supresory PU.1 a p53 byla objevena nádorová dráha zahrnující dva onkogeny: miR-155 a MYB.

V důsledku mutací těchto tumor supresorů p53 a PU.1 dochází v c-Kit⁺ progenitorech u PU.1^{ure/ure}p53^{-/-} myši k neefektivní represi onkogenu Myb, jehož exprese výrazně vzroste. Následně tato vysoká exprese Myb aktivuje miR-155, který ještě více sníží hladinu exprese PU.1. Dráha Myb/miR-155/PU.1 je vysoce aktivovaná, což vede ke zrychlené patogenezi AML se zřetelnými agresivními rysy.

Ukázali jsme funkční propojení mezi změnou v regulaci onkogenů Myb a miR-155 a tumor supresory PU.1 a p53 a jejich vzájemný efekt na buněčný růst AML progenitorů *in vitro*. Manipulace těchto faktorů (buď inhibice onkogenů (Myb a miR-155), nebo znovuoobnovení PU.1) vede k obnově základních vlastností poškozené krvetvorby a k diferenciaci leukemických blastů.

Jednoznačně jsme ukázali, že popsaná molekulární dráha p53/MYB/miR-155/PU.1, jež byla identifikována na myších modelech, existuje i v lidské AML. Navíc bylo ukázáno, že lze ovlivňovat jednotlivé členy této dráhy tak, aby došlo k znovuoobnovení krvetvorných procesů.

SPOLUAUTOŘI

Petra Vlčková napsala disertační práci a pod dohledem svého školitele prováděla následující experimentální postupy: rutinní buněčné kultivační práce, práce se zvířaty (myši), odebrání orgánů a izolace mononukleárních buněk potřebných pro experimenty, genotypování, izolace mRNA/mikroRNA, qRT-PCR, transfekce (Amaxa, DMRIE-c), průtoková cytometrie, magnetická separace a kultivační detekce kolonie-tvořících buněk (mouse colony-forming cell assays). Ostatní členové laboratoře mi pomohli s následujícími postupy: Pavel Burda s chromatinovou imunoprecipitací, Filipp Savvulidi se separací buněk pomocí průtokové cytometrie, Karin Vargová s přípravou vzorků pacientů (Ficoll-Paque) a Erika Kužmová s genotypováním myší. Analýzu na vzorcích pacientů prováděl Vít Pospíšil. Libor Staněk prováděl cytologické, histologické a imunohistochemické barvení slezin a kostní dřeně a barvení krevních nátěrů. Klinické údaje byly shromážděny Annou Jonášovou. Můj školitel, Tomáš Stopka mi pomohl s experimentálním designem a revidoval disertační práci.

ODKAZY NA POUŽITOU LITERATURU

- Abbas, H. a, Pant, V., & Lozano, G. (2011). The ups and downs of p53 regulation in hematopoietic stem cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(19), 3257–62. doi:10.4161/cc.10.19.17721
- Akashi K, Traver D, Kondo M, W. I. (1999). Lymphoid development from hematopoietic stem cells. *Int J Hematol.*, 69(4), 217–26.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., & Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404(6774), 193–7. doi:10.1038/35004599
- Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Grosse, F., Kim, E., Wiesmüller, L., & Deppert, W. (1999). Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene*, 18(53), 7706–17. doi:10.1038/sj.onc.1202952
- Alm-Kristiansen, a H., Saether, T., Matre, V., Gilfillan, S., Dahle, O., & Gabrielsen, O. S. (2008). FLASH acts as a co-activator of the transcription factor c-Myb and localizes to active RNA polymerase II foci. *Oncogene*, 27(34), 4644–56. doi:10.1038/onc.2008.105
- Anderson, K. L., Smith, K. a, Pio, F., Torbett, B. E., & Maki, R. a. (1998). Neutrophils deficient in PU.1 do not terminally differentiate or become functionally competent. *Blood*, 92(5), 1576–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9716585>
- Appelbaum, F R. (2001). Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*, 411(6835), 385–9. doi:10.1038/35077251
- Appelbaum, Frederick R, Gundacker, H., Head, D. R., Slovak, M. L., Willman, C. L., Godwin, J. E., ... Petersdorf, S. H. (2006). Age and acute myeloid leukemia. *Blood*, 107(9), 3481–5. doi:10.1182/blood-2005-09-3724
- Appella, E., & Anderson, C. W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European journal of biochemistry / FEBS*, 268(10), 2764–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11358490>
- Aziz, N., Miglarese, M. R., Hendrickson, R. C., Shabanowitz, J., Sturgill, T. W., Hunt, D. F., & Bender, T. P. (1995). Modulation of c-Myb-induced transcription activation by a phosphorylation site near the negative regulatory domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(14), 6429–33. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=41531&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Back, J., Allman, D., Chan, S., & Kastner, P. (2005). Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Experimental hematology*, 33(4), 395–402. doi:10.1016/j.exphem.2004.12.010
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Wang, Z., ... Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4), 823–37. doi:10.1016/j.cell.2007.05.009
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215–33. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002

- Bartel, D. P., Lee, R., & Feinbaum, R. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Genomics*, 116, 281–297.
- Bartkova, J., Horejsí, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., ... Bartek, J. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 434(7035), 864–70. doi:10.1038/nature03482
- Berezikov, E. (2011). Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nature reviews. Genetics*, 12(12), 846–60. doi:10.1038/nrg3079
- Biedenkapp H. (1988). Viral myb oncogene encodes a sequence specific DNA binding activity.
- Bode, A. M., & Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature reviews. Cancer*, 4(10), 793–805. doi:10.1038/nrc1455
- Bonadies, N, Neururer, C., Steege, a, Vallabhapurapu, S., Pabst, T., & Mueller, B. U. (2010). PU.1 is regulated by NF-kappaB through a novel binding site in a 17 kb upstream enhancer element. *Oncogene*, 29(7), 1062–72. doi:10.1038/onc.2009.371
- Bonadies, Nicola, Pabst, T., & Mueller, B. U. (2010). Heterozygous deletion of the PU.1 locus in human AML. *Blood*, 115(2), 331–4. doi:10.1182/blood-2009-03-212225
- Bonnet D, D. J. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.*, 3(7), 730–7.
- Boyle, W. J., Lipsick, J. S., Reddy, E. P., & Baluda, M. a. (1983). Identification of the leukemogenic protein of avian myeloblastosis virus and of its normal cellular homologue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(10), 2834–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=393926&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Braun, J. E., Huntzinger, E., Fauser, M., & Izaurralde, E. (2011). GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Molecular cell*, 44(1), 120–33. doi:10.1016/j.molcel.2011.09.007
- Breving, K., & Esquela-Kerscher, A. (2010). The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(8), 1316–29. doi:10.1016/j.biocel.2009.09.016
- Burda, P., Curik, N., Kokavec, J., Basova, P., Mikulenkova, D., Skoultchi, A. I., ... Stopka, T. (2009). PU.1 activation relieves GATA-1-mediated repression of Cebpa and Cbfb during leukemia differentiation. *Molecular cancer research*: MCR, 7(10), 1693–703. doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0031
- Byrd, J. C., Mrózek, K., Dodge, R. K., Carroll, A. J., Edwards, C. G., Arthur, D. C., ... Bloomfield, C. D. (2002). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*, 100(13), 4325–36. doi:10.1182/blood-2002-03-0772
- Calame, K. (2007). MicroRNA-155 function in B Cells. *Immunity*, 27(6), 825–7. doi:10.1016/j.immuni.2007.11.010
- Calin, G. A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S. E., ... Croce, C. M. (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, 353(17), 1793–801. doi:10.1056/NEJMoa050995

- Cammarata, G., Augugliaro, L., Salemi, D., Agueli, C., La Rosa, M., Dagnino, L., ... Santoro, A. (2010). Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia. *American journal of hematology*, 85(5), 331–9. doi:10.1002/ajh.21667
- Canale, S., Cocco, C., Frasson, C., Segnanfreddo, E., Di Carlo, E., Ognio, E., ... Airoidi, I. (2011). Interleukin-27 inhibits pediatric B-acute lymphoblastic leukemia cell spreading in a preclinical model. *Leukemia*, 25(12), 1815–24. doi:10.1038/leu.2011.158
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642–55. doi:10.1016/j.cell.2009.01.035
- Clappier, E., Cucuini, W., Kalota, A., Crinquette, A., Cayuela, J., Dik, W. A., ... Gewirtz, A. M. (2007). The C-MYB locus is involved in chromosomal translocation and genomic duplications in human T-cell acute leukemia (T-ALL), the translocation defining a new T-ALL subtype in very young children, 110(4), 1–3. doi:10.1182/blood-2006-12-064683.The
- Cook WD, McCaw BJ, Herring C, John DL, Foote SJ, Nutt SL, A. J. (2004). PU.1 is a suppressor of myeloid leukemia, inactivated in mice by gene deletion and mutation of its DNA binding domain. *Blood*, 104(12), 3437–3444. doi:10.1182/blood-
- Costinean, S., Zanesi, N., Pekarsky, Y., Tili, E., Volinia, S., Heerema, N., & Croce, C. M. (2006). Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(18), 7024–9. doi:10.1073/pnas.0602266103
- Curik, N., Burda, P., Vargova, K., Pospisil, V., Belickova, M., Vlckova, P., ... Stopka, T. (2012). 5-azacitidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity. *Leukemia*, 26(8), 1804–11. doi:10.1038/leu.2012.47
- Dahl, R., Walsh, J. C., Lancki, D., Laslo, P., Iyer, S. R., Singh, H., & Simon, M. C. (2003). Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nature immunology*, 4(10), 1029–36. doi:10.1038/ni973
- DeKoter, R P, Walsh, J. C., & Singh, H. (1998). PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *The EMBO journal*, 17(15), 4456–68. doi:10.1093/emboj/17.15.4456
- DeKoter, Rodney P, Kamath, M. B., & Houston, I. B. (2007). Analysis of concentration-dependent functions of PU.1 in hematopoiesis using mouse models. *Blood cells, molecules & diseases*, 39(3), 316–20. doi:10.1016/j.bcmd.2007.06.004
- Derolf, A. R., Kristinsson, S. Y., Andersson, T. M.-L., Landgren, O., Dickman, P. W., & Björkholm, M. (2009). Improved patient survival for acute myeloid leukemia: a population-based study of 9729 patients diagnosed in Sweden between 1973 and 2005. *Blood*, 113(16), 3666–72. doi:10.1182/blood-2008-09-179341
- Dixon-McIver, A., East, P., Mein, C. a, Cazier, J.-B., Molloy, G., Chaplin, T., ... Debernardi, S. (2008). Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PloS one*, 3(5), e2141. doi:10.1371/journal.pone.0002141
- Domen J, W. I. (1999). Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol Med Today.*, 5(5), 201–8.

- Donehower, L., Harvey, M., Slagle, B., McArthur, M., Montgomery Jr, C. A., Butel, J. S., & Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356(6366), 215–221. Retrieved from <http://www.tmd.ac.jp/med/phy2/Rindokupapers/p53KOmice.pdf>
- Eis, P. S., Tam, W., Sun, L., Chadburn, A., Li, Z., Gomez, M. F., ... Dahlberg, J. E. (2005). Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(10), 3627–32. doi:10.1073/pnas.0500613102
- Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M., & Harrison, S. C. (1994). Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes & Development*, 8(8), 970–980. doi:10.1101/gad.8.8.970
- Elton, T. S., Selemon, H., Elton, S. M., & Parinandi, N. L. (2013). Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene*, 532(1), 1–12. doi:10.1016/j.gene.2012.12.009
- Emambokus, N., Vegiopoulos, A., Harman, B., Jenkinson, E., Anderson, G., & Frampton, J. (2003). Progression through key stages of haemopoiesis is dependent on distinct threshold levels of c-Myb. *The EMBO journal*, 22(17), 4478–88. doi:10.1093/emboj/cdg434
- Epstein, C. B., Attiyeh, E. F., Hobson, D. a, Silver, a L., Broach, J. R., & Levine, a J. (1998). P53 Mutations Isolated in Yeast Based on Loss of Transcription Factor Activity: Similarities and Differences From P53 Mutations Detected in Human Tumors. *Oncogene*, 16(16), 2115–22. doi:10.1038/sj.onc.1201734
- Fabian, M. R., Sonenberg, N., & Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual review of biochemistry*, 79, 351–79. doi:10.1146/annurev-biochem-060308-103103
- Faraoni, I., Antonetti, F. R., Cardone, J., & Bonmassar, E. (2009). miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochimica et biophysica acta*, 1792(6), 497–505. doi:10.1016/j.bbadis.2009.02.013
- Fenaux P, Preudhomme C, Quikandon I, Jonveaux P, Lai JL, Vanrumbeke M, Loucheux-Lefebvre MH, Bauters F, Berger R, K. J. (1992). Mutations of the P53 gene in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.*, 80(2), 178–83.
- Fernando, T. R., Rodriguez-Malave, N. I., & Rao, D. S. (2012). MicroRNAs in B cell development and malignancy. *Journal of hematology & oncology*, 5(1), 7. doi:10.1186/1756-8722-5-7
- Friedman, D. R., Weinberg, J. B., Barry, W. T., Goodman, B. K., Volkheimer, A. D., Bond, K. M., ... Nevins, J. R. (2009). A genomic approach to improve prognosis and predict therapeutic response in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical cancer research* □: an official journal of the American Association for Cancer Research, 15(22), 6947–55. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1132
- Fulci, V., Chiaretti, S., Goldoni, M., Azzalin, G., Carucci, N., Tavolaro, S., ... Macino, G. (2007). Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 109(11), 4944–51. doi:10.1182/blood-2006-12-062398
- Gatz, S. a, & Wiesmüller, L. (2006). P53 in Recombination and Repair. *Cell death and differentiation*, 13(6), 1003–16. doi:10.1038/sj.cdd.4401903
- Ghani, S., Riemke, P., Schönheit, J., Lenze, D., Stumm, J., Hoogenkamp, M., ... Rosenbauer, F. (2011). Macrophage development from HSCs requires PU.1-

- coordinated microRNA expression. *Blood*, 118(8), 2275–84. doi:10.1182/blood-2011-02-335141
- Graves BJ, P. J. (1998). Specificity within the ets family of transcription factors. *Adv Cancer Res.*, (75), 1–55.
- Greig, K. T., de Graaf, C. a, Murphy, J. M., Carpinelli, M. R., Pang, S. H. M., Frampton, J., ... Nutt, S. L. (2010). Critical roles for c-Myb in lymphoid priming and early B-cell development. *Blood*, 115(14), 2796–805. doi:10.1182/blood-2009-08-239210
- Griffin JD, L. B. (1986). Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood*, 68(6), 1185–1195.
- Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G., ... Grimwade, B. D. (1998). The Importance of Diagnostic Cytogenetics on Outcome in AML: Analysis of 1,612 Patients Entered Into the MRC AML 10 Trial. *Blood*, 92(7), 2322–2333.
- Guinn BA, M. K. (1997). p53 mutations, methylation and genomic instability in the progression of chronic myeloid leukaemia. *Leuk Lymphoma.*, 26(3-4), 211–26.
- Haasch, D., Chen, Y.-W., Reilly, R. M., Chiou, X. G., Koterski, S., Smith, M. L., ... Trevillyan, J. M. (2002). T cell activation induces a noncoding RNA transcript sensitive to inhibition by immunosuppressant drugs and encoded by the proto-oncogene, BIC. *Cellular immunology*, 217(1-2), 78–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12426003>
- Haferlach, C., Dicker, F., Herholz, H., Schnittger, S., Kern, W., & Haferlach, T. (2008). Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*: official journal of the Leukemia Society of America, *Leukemia Research Fund, U.K.*, 22(8), 1539–41. doi:10.1038/leu.2008.143
- He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., ... Hammond, S. M. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435(7043), 828–33. doi:10.1038/nature03552
- Hermeking H, E. D. (1994). Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science*, 265(5181), 2091–3.
- Hess, J. L., Bittner, C. B., Zeisig, D. T., Bach, C., Fuchs, U., Borkhardt, A., ... Hoxa, A. (2006). c-Myb is an essential downstream target for homeobox-mediated transformation of hematopoietic cells, 108(1), 297–304. doi:10.1182/blood-2005-12-5014.Supported
- Hollstein M, Marion MJ, Lehman T, Welsh J, Harris CC, Martel-Planche G, Kusters I, M. R. (1994). p53 mutations at A:T base pairs in angiosarcomas of vinyl chloride-exposed factory workers. *Carcinogenesis*, 15(1), 1–3.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, H. C. (1991). Hollstein 1991. *Science*, 253(5015), 49–53.
- Hoogenkamp, M., Kryszinska, H., Ingram, R., Huang, G., Barlow, R., Clarke, D., ... Bonifer, C. (2007). The Pu.1 locus is differentially regulated at the level of chromatin structure and noncoding transcription by alternate mechanisms at distinct developmental stages of hematopoiesis. *Molecular and cellular biology*, 27(21), 7425–38. doi:10.1128/MCB.00905-07
- Hoogenkamp, M., Lichtinger, M., Kryszinska, H., Lancrin, C., Clarke, D., Williamson, A., ... Bonifer, C. (2009). Early chromatin unfolding by RUNX1: a molecular

- explanation for differential requirements during specification versus maintenance of the hematopoietic gene expression program. *Blood*, 114(2), 299–309. doi:10.1182/blood-2008-11-191890
- Horn, H. F., & Vousden, K. H. (2007). Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene*, 26(9), 1306–16. doi:10.1038/sj.onc.1210263
- Hu G, Zhang W, D. A. (1992). P53 gene mutations in acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.*, 81(4), 489–94.
- Hutvagner, G, McLachlan, J., Pasquinelli, a E., Bálint, E., Tuschl, T., & Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5531), 834–8. doi:10.1126/science.1062961
- Hutvagner, György, & Zamore, P. D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5589), 2056–60. doi:10.1126/science.1073827
- Chang, S., & Sharan, S. K. (2012). Epigenetic control of an oncogenic microRNA, miR-155, by BRCA1. *Oncotarget*, 3(1), 5–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3292886&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Chen H, Ray-Gallet D, Zhang P, Hetherington CJ, Gonzalez DA, Zhang DE, Moreau-Gachelin F, T. D. (1995). PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene*, 11(8), 1549–60.
- Chen, H., Zhang, P., Radomska, H. S., Hetherington, C. J., Zhang, D., Tenen, D. G., & Oncogene, D. G. (1996). Octamer Binding Factors and Their Coactivator Can Activate the Murine PU . 1 (spi-1) Promoter * critical for development of both of these lineages . *Our*, 271(26), 15743–15752.
- Chen, L., Widhopf, G., Huynh, L., Rassenti, L., Rai, K. R., Weiss, A., & Kipps, T. J. (2002). Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 100(13), 4609–14. doi:10.1182/blood-2002-06-1683
- Christiansen, B. D. H., Andersen, M. K., & Pedersen-bjergaard, J. (2001). Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol.*, 19(5), 1405–1413.
- Iwai, N., & Naraba, H. (2005). Polymorphisms in human pre-miRNAs. *Biochemical and biophysical research communications*, 331(4), 1439–44. doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.051
- Jacks, T., Remington, L., Williams, B. O., Schmitt, E. M., Halachmi, S., Bronson, R. T., & Weinberg, R. a. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Current biology*: CB, 4(1), 1–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7922305>
- Johnson, L., Mercer, K., Greenbaum, D., Bronson, R. T., Crowley, D., Tuveson, D. a, & Jacks, T. (2001). Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature*, 410(6832), 1111–6. doi:10.1038/35074129
- Juliussøn, G., Antunovic, P., Derolf, A., Lehmann, S., Möllgård, L., Stockelberg, D., ... Höglund, M. (2009). Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision

- to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*, 113(18), 4179–87. doi:10.1182/blood-2008-07-172007
- Klemsz, M. J., & Maki, R. A. (1996). Activation of transcription by PU . 1 requires both acidic and glutamine domains . These include□: Activation of Transcription by PU . 1 Requires both Acidic and Glutamine Domains, 16(1).
- Klemsz, M. J., McKercher, S. R., Celada, a, Van Beveren, C., & Maki, R. a. (1990). The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell*, 61(1), 113–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18641294>
- Kluiver, J., Poppema, S., de Jong, D., Blokzijl, T., Harms, G., Jacobs, S., ... van den Berg, A. (2005). BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *The Journal of pathology*, 207(2), 243–9. doi:10.1002/path.1825
- Kodandapani R, Pio F, Ni CZ, Piccialli G, Klemsz M, McKercher S, Maki RA, E. K. (1996). A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS-domain-DNA complex. *Nature*, 380(6573), 456–60.
- Kondo, M., Weissman, I. L., & Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, 91(5), 661–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393859>
- Kong, W., Yang, H., He, L., Zhao, J., Coppola, D., Dalton, W. S., & Cheng, J. Q. (2008). MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Molecular and cellular biology*, 28(22), 6773–84. doi:10.1128/MCB.00941-08
- Koschmieder S, R. F. (2005). Role of transcription factors C/EBPα and PU. 1 in normal hematopoiesis and leukemia.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693–705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic acids research*, 39(Database issue), D152–7. doi:10.1093/nar/gkq1027
- Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature reviews. Genetics*, 11(9), 597–610. doi:10.1038/nrg2843
- Kubbutat MH, V. K. (1998). Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Mol Med Today*, 4(6), 250–6.
- Lahortiga, I., De Keersmaecker, K., Van Vlierberghe, P., Graux, C., Cauwelier, B., Lambert, F., ... Cools, J. (2007). Duplication of the MYB oncogene in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*, 39(5), 593–5. doi:10.1038/ng2025
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, D. J. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464), 645–8.
- Laslo, P., Spooner, C. J., Warmflash, A., Lancki, D. W., Lee, H.-J., Sciammas, R., ... Singh, H. (2006). Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell*, 126(4), 755–66. doi:10.1016/j.cell.2006.06.052

- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20), 4051–60. doi:10.1038/sj.emboj.7600385
- Lei, W., Rushton, J. J., Davis, L. M., Liu, F., & Ness, S. a. (2004). Positive and negative determinants of target gene specificity in myb transcription factors. *The Journal of biological chemistry*, 279(28), 29519–27. doi:10.1074/jbc.M403133200
- Leng, R.-X., Pan, H.-F., Qin, W.-Z., Chen, G.-M., & Ye, D.-Q. (2011). Role of microRNA-155 in autoimmunity. *Cytokine & growth factor reviews*, 22(3), 141–7. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.05.002
- Levine, a J. (1997). P53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*, 88(3), 323–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039259>
- Lewis, B. P., Shih, I., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Burge, C. B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115(7), 787–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697198>
- Li, P., Grgurevic, S., Liu, Z., Harris, D., Rozovski, U., Calin, G. a, ... Estrov, Z. (2013). Signal transducer and activator of transcription-3 induces MicroRNA-155 expression in chronic lymphocytic leukemia. *PloS one*, 8(6), e64678. doi:10.1371/journal.pone.0064678
- Li, Y., Okuno, Y., Zhang, P., Radomska, H. S., Chen, H., Iwasaki, H., ... Tenen, D. G. (2001). Regulation of the PU.1 gene by distal elements. *Blood*, 98(10), 2958–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17213386>
- Li, Z., Lu, J., Sun, M., Mi, S., Zhang, H., Luo, R. T., ... Chen, J. (2008). Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15535–40. doi:10.1073/pnas.0808266105
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., ... Johnson, J. M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433(7027), 769–73. doi:10.1038/nature03315
- Luger, S. M. (2002). Oligodeoxynucleotide-mediated inhibition of c-myc gene expression in autografted bone marrow: a pilot study. *Blood*, 99(4), 1150–1158. doi:10.1182/blood.V99.4.1150
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5654), 95–8. doi:10.1126/science.1090599
- Ma, X., Ma, C., & Zheng, X. (2013). MicroRNA-155 in the pathogenesis of atherosclerosis: a conflicting role? *Heart, lung & circulation*, 22(10), 811–8. doi:10.1016/j.hlc.2013.05.651
- Mannefeld, M., Klassen, E., & Gaubatz, S. (2009). B-MYB is required for recovery from the DNA damage-induced G2 checkpoint in p53 mutant cells. *Cancer research*, 69(9), 4073–80. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4156
- Manz, M. G. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood*, 97(11), 3333–3341. doi:10.1182/blood.V97.11.3333
- Marton, S., Garcia, M. R., Robello, C., Persson, H., Trajtenberg, F., Pritsch, O., ... Cayota, a. (2008). Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis. *Leukemia*, 22(2), 330–8. doi:10.1038/sj.leu.2405022

- McKercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H., ... Maki, R. a. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *The EMBO journal*, 15(20), 5647–58. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=452309&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Meek, D. W. (2009). Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nature reviews. Cancer*, 9(10), 714–23. doi:10.1038/nrc2716
- Metcalfe, D., Dakic, A., Mifsud, S., Di Rago, L., Wu, L., & Nutt, S. (2006). Inactivation of PU.1 in adult mice leads to the development of myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5), 1486–91. doi:10.1073/pnas.0510616103
- Metzler, M., Wilda, M., Busch, K., Viehmann, S., & Borkhardt, A. (2004). High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes, chromosomes & cancer*, 39(2), 167–9. doi:10.1002/gcc.10316
- Michal Karas. (2011). Akutní myeloidní leukemie u nemocných nad 60 let, možnosti její léčby a potenciální role alogenní transplantace krvetvorných buněk. *Onkologie*, 5(2), 91–95.
- Miyashita, T., & Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80(2), 293–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7834749>
- Moreau-Gachelin, Françoise, Tavittian Armand, T. P. (1988). Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature*, 331(21), 277–280.
- Morrison, S. J., Wandycz, a M., Hemmati, H. D., Wright, D. E., & Weissman, I. L. (1997). Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development (Cambridge, England)*, 124(10), 1929–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9169840>
- Mraz, M., & Kipps, T. J. (2013). MicroRNAs and B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 54(8), 1836–9. doi:10.3109/10428194.2013.796055
- Mucenski, M. L., McLain, K., Kier, a B., Swerdlow, S. H., Schreiner, C. M., Miller, T. a, ... Potter, S. S. (1991). A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell*, 65(4), 677–89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1709592>
- Mueller, B. U., Pabst, T., Osato, M., Asou, N., Johansen, L. M., Minden, M. D., ... Tenen, D. G. (2002). Heterozygous PU . 1 mutations are associated with acute myeloid leukemia, 100(3), 998–1007.
- Mueller, B. U., Pabst, T., Petkovic, V., Fey, M. F., Asou, N., Buergi, U., & Tenen, D. G. (2006). NEOPLASIA ATRA resolves the differentiation block in t (15□; 17) acute myeloid leukemia by restoring PU . 1 expression, 107(8), 3330–3338. doi:10.1182/blood-2005-07-3068.Supported
- Murati, a, Gervais, C., Carbuccia, N., Finetti, P., Cervera, N., Adélaïde, J., ... Birnbaum, D. (2009). Genome profiling of acute myelomonocytic leukemia: alteration of the MYB locus in MYST3-linked cases. *Leukemia*, 23(1), 85–94. doi:10.1038/leu.2008.257
- Nakano, K., & Vousden, K. H. (2001). PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Molecular cell*, 7(3), 683–694.

- Nakano, Y., Naoe, T., Kiyoi, H., Kitamura, K., Minami, S., Miyawaki, S., ... Ohno, R. (2000). Prognostic value of p53 gene mutations and the product expression in de novo acute myeloid leukemia. *European journal of haematology*, 65(1), 23–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10914936>
- Neiman, P. E., Elsaesser, K., Loring, G., & Kimmell, R. (2008). Myc oncogene-induced genomic instability: DNA palindromes in bursal lymphomagenesis. *PLoS genetics*, 4(7), e1000132. doi:10.1371/journal.pgen.1000132
- Nerlov, C., & Graf, T. (1998). PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes & Development*, 12(15), 2403–2412. doi:10.1101/gad.12.15.2403
- Noel, G., DeKoter, R. P., Wang, Q., Hexley, P., & Ogle, C. K. (2012). Optimization and application of a flow cytometric PU.1 assay for murine immune cells. *Journal of immunological methods*, 382(1-2), 81–92. doi:10.1016/j.jim.2012.05.008
- Nomura N, Takahashi M, Matsui M, Ishii S, Date T, Sasamoto S, I. R. (1988). Isolation of human cDNA clones of myb-related genes, A-myb and B-myb. *Nucleic Acids Res.*, 16(23), 11075–11089.
- Nutt, S. L., Metcalf, D., D’Amico, A., Polli, M., & Wu, L. (2005). Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. *The Journal of experimental medicine*, 201(2), 221–31. doi:10.1084/jem.20041535
- O’Connell, R. M., Rao, D. S., Chaudhuri, A. a, Boldin, M. P., Taganov, K. D., Nicoll, J., ... Baltimore, D. (2008). Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *The Journal of experimental medicine*, 205(3), 585–94. doi:10.1084/jem.20072108
- O’Connell, R. M., Taganov, K. D., Boldin, M. P., Cheng, G., & Baltimore, D. (2007). MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(5), 1604–9. doi:10.1073/pnas.0610731104
- O’Neil, J., & Look, a T. (2007). Mechanisms of transcription factor deregulation in lymphoid cell transformation. *Oncogene*, 26(47), 6838–49. doi:10.1038/sj.onc.1210766
- O’Rourke, J. P., & Ness, S. a. (2008). Alternative RNA splicing produces multiple forms of c-Myb with unique transcriptional activities. *Molecular and cellular biology*, 28(6), 2091–101. doi:10.1128/MCB.01870-07
- Oda, E. (2000). Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *Science*, 288(5468), 1053–1058. doi:10.1126/science.288.5468.1053
- Oh, I. H., & Reddy, E. P. (1999). The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene*, 18(19), 3017–33. doi:10.1038/sj.onc.1202839
- Oikawa, T., Yamada, T., Kihara-Negishi, F., Yamamoto, H., Kondoh, N., Hitomi, Y., & Hashimoto, Y. (1999). The role of Ets family transcription factor PU.1 in hematopoietic cell differentiation, proliferation and apoptosis. *Cell death and differentiation*, 6(7), 599–608. doi:10.1038/sj.cdd.4400534
- Okuno, Y., Huang, G., Rosenbauer, F., Evans, E. K., Radomska, H. S., Iwasaki, H., ... Tenen, D. G. (2005). Potential Autoregulation of Transcription Factor PU . 1 by an Upstream Regulatory Element, 25(7), 2832–2845. doi:10.1128/MCB.25.7.2832

- Olivier M, Hussain SP, Caron de Fromentel C, Hainaut P, H. C. (2004). TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. *IARC Sci Publ.*, 157, 247–70.
- Oren, M. (1999). Regulation of the p53 Tumor Suppressor Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 274(51), 36031–36034. doi:10.1074/jbc.274.51.36031
- Parry, T. E. (1997). The non-random distribution of point mutations in leukaemia and myelodysplasia--a possible pointer to their aetiology. *Leuk Res.*, 21(6), 559–574.
- Passegué, E., Jamieson, C. H. M., Ailles, L. E., & Weissman, I. L. (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 Suppl , 11842–9. doi:10.1073/pnas.2034201100
- Patel, G., Kreider, B., Rovera, G., & Reddy, E. P. (1993). v-myb blocks granulocyte colony-stimulating factor-induced myeloid cell differentiation but not proliferation. *Mol Cell Biol.*, 13(4), 2269–76. doi:10.1128/MCB.13.4.2269.Updated
- Pattabiraman, D R, & Gonda, T. J. (2013). Role and potential for therapeutic targeting of MYB in leukemia. *Leukemia*, 27(2), 269–77. doi:10.1038/leu.2012.225
- Pattabiraman, Diwakar R, Sun, J., Dowhan, D. H., Ishii, S., & Gonda, T. J. (2009). Mutations in multiple domains of c-Myb disrupt interaction with CBP/p300 and abrogate myeloid transforming ability. *Molecular cancer research* □: MCR, 7(9), 1477–86. doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0070
- Persson, M., Andrén, Y., Mark, J., Horlings, H. M., Persson, F., & Stenman, G. (2009). Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44), 18740–4. doi:10.1073/pnas.0909114106
- Pospisil, V., Vargova, K., Kokavec, J., Rybarova, J., Savvulidi, F., Jonasova, A., ... Stopka, T. (2011). Epigenetic silencing of the oncogenic miR-17-92 cluster during PU.1-directed macrophage differentiation. *The EMBO journal*, 30(21), 4450–64. doi:10.1038/emboj.2011.317
- Preisler HD, Raza A, Larson R, LeBeau M, Browman G, Goldberg J, Grunwald H, Volger R, Verkh L, Singh P, et al. (1989). Protooncogene expression and the clinical characteristics of acute nonlymphocytic leukemia: A Leukemia Intergroup pilot study. *Blood*, 73(1), 255–262.
- Rajewsky, N. (2006). microRNA target predictions in animals. *Nature genetics*, 38 Suppl(June), S8–13. doi:10.1038/ng1798
- Ramsay, R. G., & Gonda, T. J. (2008). MYB function in normal and cancer cells. *Nature reviews. Cancer*, 8(7), 523–34. doi:10.1038/nrc2439
- Rao, G., Rekhtman, N., Cheng, G., Krasikov, T., & Skoultschi, a I. (1997). Deregulated expression of the PU.1 transcription factor blocks murine erythroleukemia cell terminal differentiation. *Oncogene*, 14(1), 123–31. doi:10.1038/sj.onc.1200807
- Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, van Dongen S, Grocock RJ, Das PP, Miska EA, Vetrie D, Okkenhaug K, Enright AJ, Dougan G, Turner M, B. A. (2007). Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*, 316(5824), 608–611. doi:10.1126/science.1139253.Requirement
- Rosenbauer, F., Wagner, K., Kutok, J. L., Iwasaki, H., Le Beau, M. M., Okuno, Y., ... Tenen, D. G. (2004). Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nature genetics*, 36(6), 624–30. doi:10.1038/ng1361

- Rossi, S., Shimizu, M., Barbarotto, E., Nicoloso, M. S., Dimitri, F., Sampath, D., ... Calin, G. a. (2010). microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood*, 116(6), 945–52. doi:10.1182/blood-2010-01-263889
- Roussel M, Saule S, Lagrou C, Rommens C, Beug H, Graf T, S. D. (1979). Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature*, 281 (5731), 452–5.
- Ryan, K. M., Phillips, a C., & Vousden, K. H. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current opinion in cell biology*, 13(3), 332–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11343904>
- Saether, T., Berge, T., Ledsaak, M., Matre, V., Alm-Kristiansen, A. H., Dahle, O., ... Gabrielsen, O. S. (2007). The chromatin remodeling factor Mi-2alpha acts as a novel co-activator for human c-Myb. *The Journal of biological chemistry*, 282(19), 13994–4005. doi:10.1074/jbc.M700755200
- Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J., & Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*, 265(5178), 1573–1577.
- Sokol, L., Caceres, G., Volinia, S., Alder, H., Nuovo, G. J., Liu, C.-G., ... List, A. F. (2011). Identification of a risk dependent microRNA expression signature in myelodysplastic syndromes. *British journal of haematology*, 153(1), 24–32. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08581.x
- Somervaille, T. C. P., Matheny, C. J., Spencer, G. J., Iwasaki, M., Rinn, J. L., Witten, D. M., ... Cleary, M. L. (2009). Hierarchical maintenance of MLL myeloid leukemia stem cells employs a transcriptional program shared with embryonic rather than adult stem cells. *Cell stem cell*, 4(2), 129–40. doi:10.1016/j.stem.2008.11.015
- Steidl, U., Steidl, C., Ebralidze, A., Chapuy, B., Han, H., Will, B., ... Tenen, D. G. (2007). A distal single nucleotide polymorphism alters long-range regulation of the PU.1 gene in acute myeloid leukemia, 117(9), 2611–2620. doi:10.1172/JCI30525.suppressor
- Stommel, J. M., Marchenko, N. D., Jimenez, G. S., Moll, U. M., Hope, T. J., & Wahl, G. M. (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *The EMBO journal*, 18(6), 1660–72. doi:10.1093/emboj/18.6.1660
- Stone RM, O'Donnell MR, S. M. (2004). Acute Myeloid Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, 98–117.
- Sun, G., Yan, J., Noltner, K., Feng, J., Li, H., Sarkis, D. a, ... Rossi, J. J. (2009). SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(9), 1640–51. doi:10.1261/rna.1560209
- Suzuki, H. I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., & Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*, 460(7254), 529–33. doi:10.1038/nature08199
- Tam, W. (2001). Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene*, 274(1-2), 157–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19188149>
- Tam, W., Ben-Yehuda, D., & Hayward, W. S. (1997). bic, a novel gene activated by proviral insertions in avian leukosis virus-induced lymphomas, is likely to function

- through its noncoding RNA. *Molecular and cellular biology*, 17(3), 1490–502. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=231875&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tan Gana, N. H., Victoriano, A. F. B., & Okamoto, T. (2012). Evaluation of online miRNA resources for biomedical applications. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 17(1), 11–27. doi:10.1111/j.1365-2443.2011.01564.x
- Tanikawa, J., Ichikawa-Iwata, E., Kanei-Ishii, C., Nakai, a, Matsuzawa, S., Reed, J. C., & Ishii, S. (2000). p53 suppresses the c-Myb-induced activation of heat shock transcription factor 3. *The Journal of biological chemistry*, 275(20), 15578–85. doi:10.1074/jbc.M000372200
- Thai, T.-H., Calado, D. P., Casola, S., Ansel, K. M., Xiao, C., Xue, Y., ... Rajewsky, K. (2007). Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5824), 604–8. doi:10.1126/science.1141229
- Thomas, M. D., Kremer, C. S., Ravichandran, K. S., Rajewsky, K., & Bender, T. P. (2005). c-Myb is critical for B cell development and maintenance of follicular B cells. *Immunity*, 23(3), 275–86. doi:10.1016/j.immuni.2005.08.005
- Tili, E., Michaille, J.-J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C. D., Adair, B., ... Croce, C. M. (2007). Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(8), 5082–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17911593>
- Tomita A, Watanabe T, Kosugi H, Ohashi H, Uchida T, Kinoshita T, Mizutani S, Hotta T, Murate T, Seto M, S. H. (1998). Tomita 1998. *Leukemia*, 12(9), 1422–9.
- Traver, D. (2000). Development of CD8alpha-Positive Dendritic Cells from a Common Myeloid Progenitor. *Science*, 290(5499), 2152–2154. doi:10.1126/science.290.5499.2152
- Trecca D, Longo L, Biondi A, Cro L, Calori R, Grignani F, Maiolo AT, Pelicci PG, N. A. (1994). Analysis of p53 gene mutations in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.*, 46(4), 304–9.
- Treiber, T., Treiber, N., & Meister, G. (2012). Regulation of microRNA biogenesis and function. *Thrombosis and haemostasis*, 107(4), 605–10. doi:10.1160/TH11-12-0836
- Van den Berg, A., Kroesen, B.-J., Kooistra, K., de Jong, D., Briggs, J., Blokzijl, T., ... Poppema, S. (2003). High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma. *Genes, chromosomes & cancer*, 37(1), 20–8. doi:10.1002/gcc.10186
- Vangala, R. K., Heiss-Neumann, M. S., Rangatia, J. S., Singh, S. M., Schoch, C., Tenen, D. G., ... Behre, G. (2003). The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. *Blood*, 101(1), 270–7. doi:10.1182/blood-2002-04-1288
- Vargova, K., Curik, N., Burda, P., Basova, P., Kulvait, V., Pospisil, V., ... Stopka, T. (2011). MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 117(14), 3816–25. doi:10.1182/blood-2010-05-285064

- Vigorito, E., Kohlhaas, S., Lu, D., & Leyland, R. (2013). miR-155: an ancient regulator of the immune system. *Immunological reviews*, 253(1), 146–57. doi:10.1111/imr.12057
- Vigorito, E., Perks, K. L., Abreu-Goodger, C., Bunting, S., Xiang, Z., Kohlhaas, S., ... Turner, M. (2007). microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity*, 27(6), 847–59. doi:10.1016/j.immuni.2007.10.009
- Volinia, S., Calin, G. a, Liu, C.-G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., ... Croce, C. M. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2257–61. doi:10.1073/pnas.0510565103
- Vousden, K. H., & Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, 137(3), 413–31. doi:10.1016/j.cell.2009.04.037
- Walter, M. J., Park, J. S., Ries, R. E., Lau, S. K. M., McLellan, M., Jaeger, S., ... Ley, T. J. (2005). Reduced PU.1 expression causes myeloid progenitor expansion and increased leukemia penetrance in mice expressing PML-RARalpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(35), 12513–8. doi:10.1073/pnas.0504247102
- Wang, J. C. Y., & Dick, J. E. (2005). Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends in cell biology*, 15(9), 494–501. doi:10.1016/j.tcb.2005.07.004
- Wang, M., Tan, L. P., Dijkstra, M. K., Lom, K. Van, Robertus, J., Harms, G., ... Berg, A. Van Den. (2008). miRNA analysis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: proliferation centres characterized by low miR-150 and high BIC / miR-155 expression, (February), 13–20. doi:10.1002/path
- Wattel, E., Preudhomme, C., Hecquet, B., Vanrumbeke, M., Quesnel, B., Dervite, I., ... Fenaux, P. (1994). P53 Mutations Are Associated With Resistance To Chemotherapy and Short Survival in Hematologic Malignancies. *Blood*, 84(9), 3148–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7949187>
- Weissman, I. L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 100(1), 157–68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647940>
- Wolff L, Koller R, Bies J, Nazarov V, Hoffman B, Amanullah A, Krall M, M. B. (1996). Retroviral insertional mutagenesis in murine promonocytic leukemias: c-myc and Mml1. *Curr Top Microbiol Immunol.*, (211), 191–9.
- Yamamoto, H., Kihara-Negishi, F., Yamada, T., Hashimoto, Y., & Oikawa, T. (1999). Physical and functional interactions between the transcription factor PU.1 and the coactivator CBP. *Oncogene*, 18(7), 1495–501. doi:10.1038/sj.onc.1202427
- Yan, H., Xue, G., Mei, Q., Wang, Y., Ding, F., Liu, M.-F., ... Sun, S. (2009). Repression of the miR-17-92 cluster by p53 has an important function in hypoxia-induced apoptosis. *The EMBO journal*, 28(18), 2719–32. doi:10.1038/emboj.2009.214
- Yeaman, C., Wang, D., Paz-priel, I., Torbett, B. E., Tenen, D. G., & Friedman, A. D. (2007). HEMATOPOIESIS C / EBP γ binds and activates the PU.1 distal enhancer to induce monocyte lineage commitment, 110(9), 3136–3142. doi:10.1182/blood-2007-03-080291.The

- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*, 17(24), 3011–6. doi:10.1101/gad.1158803
- Yin, Q., Wang, X., McBride, J., Fewell, C., & Flemington, E. (2008). B-cell receptor activation induces BIC/miR-155 expression through a conserved AP-1 element. *The Journal of biological chemistry*, 283(5), 2654–62. doi:10.1074/jbc.M708218200
- Yoshida, M., Shiojima, I., Ikeda, H., & Komuro, I. (2009). Chronic doxorubicin cardiotoxicity is mediated by oxidative DNA damage-ATM-p53-apoptosis pathway and attenuated by pitavastatin through the inhibition of Rac1 activity. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 47(5), 698–705. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.07.024
- Zdenek Adam, Marta Krejci, J. V. a kolektiv. (2008). *Hematologie - Přehled maligních hematologických nemocí* (pp. 29–38).
- Zhang, LinLin Zhang, G. C. (2006). MicroRNAs A New Insight into Cancer Genome. *Cell Cycle*, 5(19), 2216–2219.
- Zhao, Z., Zuber, J., Diaz-Flores, E., Lintault, L., Kogan, S. C., Shannon, K., & Lowe, S. W. (2010). p53 loss promotes acute myeloid leukemia by enabling aberrant self-renewal. *Genes & development*, 24(13), 1389. doi:10.1101/gad.1940710.7
- Zhou, H., Huang, X., Cui, H., Luo, X., Tang, Y., Chen, S., ... Shen, N. (2010). miR-155 and its star-form partner miR-155* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*, 116(26), 5885–94. doi:10.1182/blood-2010-04-280156
- Zhu, Y.-D., Wang, L., Sun, C., Fan, L., Zhu, D.-X., Fang, C., ... Xu, W. (2012). Distinctive microRNA signature is associated with the diagnosis and prognosis of acute leukemia. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 29(4), 2323–31. doi:10.1007/s12032-011-0140-5
- Zilfou, J. T., & Lowe, S. W. (2009). Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(5), a001883. doi:10.1101/cshperspect.a001883
- Zuo T, Wang L, Morrison C, Chang X, Zhang H, Li W, Liu Y, Wang Y, Liu X, Chan MW, Liu JQ, Love R, Liu CG, Godfrey V, Shen R, Huang TH, Yang T, Park BK, Wang CY, Zheng P, L. Y. (2007). FOXP3 is an X linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER2 Erb2 oncogene. *Cell*, 129(7), 1275–86.

SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA:

Basova P, Pospisil V, Savvulidi F, Burda P, Vargova K, Stanek L, Dluhosova M, Kuzmova E, Jonasova A, Steidl U, Laslo P, Stopka T. Aggressive acute myeloid leukemia in PU.1/p53 double-mutant mice. *Oncogene* (2013) Oct 14. doi: 10.1038/onc.2013.414. [Epub ahead of print] **IF = 7,35**

Curik N, Burda P, Vargova K, Pospisil V, Belickova M, **Vlckova P**, Savvulidi F, Necas E, Hajkova H, Haskovec C, Cermak J, Krivjanska M, Trneny M, Laslo P, Jonasova A, Stopka T. 5-Azacitidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity. *Leukemia* (2012): doi: 10.1038/leu.2012.47. [Epub ahead of print] **IF = 8,99**

Vargova K, Curik N, Burda P, **Basova P**, Kulvait V, Pospisil V, Savvulidi F, Kokavec J, Necas E, Berkova A, Obrtlíkova P, Karban J, Mraz M, Pospisilova S, Mayer J, Trneny M, Zavadil J, Stopka T. MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **117** (2011): 3816-3825. **IF = 10,432**

Burda P, Curik N, Kokavec J, **Basova P**, Mikulenkova D, Skoultchi AI, Zavadil J and Stopka T. PU.1 activation relieves GATA-1-mediated repression of Cebpa and Cbfb during leukemia differentiation. *Mol. Cancer Res.* **7** (2009): 1693-1703. **IF = 4,533**

Souhrnný impakt faktor publikací autora: **31,305**

PŘÍLOHY

Příloha 1

Basova P, Pospisil V, Savvulidi F, Burda P, Vargova K, Stanek L, Dluhosova M, Kuzmova E, Jonasova A, Steidl U, Laslo P, Stopka T. Aggressive acute myeloid leukemia in PU.1/p53 double-mutant mice. *Oncogene* (2013) Oct 14. doi: 10.1038/onc.2013.414. [Epub ahead of print] **IF = 7,35**

Příloha 2

Curik N, Burda P, Vargova K, Pospisil V, Belickova M, **Vlckova P**, Savvulidi F, Necas E, Hajkova H, Haskovec C, Cermak J, Krivjanska M, Trneny M, Laslo P, Jonasova A, Stopka T. 5-Azacitidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity. *Leukemia* (2012): doi: 10.1038/leu.2012.47. [Epub ahead of print] **IF = 8,99**

Příloha 3

Vargova K, Curik N, Burda P, **Basova P**, Kulvait V, Pospisil V, Savvulidi F, Kokavec J, Necas E, Berkova A, Obrtlíkova P, Karban J, Mraz M, Pospisilova S, Mayer J, Trnec M, Zavadil J, Stopka T. MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **117** (2011): 3816-3825. **IF = 10,432**

Příloha 4

Burda P, Curik N, Kokavec J, **Basova P**, Mikulenkova D, Skoultchi AI, Zavadil J and Stopka T. PU.1 activation relieves GATA-1-mediated repression of Cebpa and Cbfb during leukemia differentiation. *Mol. Cancer Res.* **7** (2009): 1693-1703. **IF = 4,533**